



Régulation du métabolisme énergétique : étude du remodelage bioénergétique du cancer

Emilie Obre

► To cite this version:

Emilie Obre. Régulation du métabolisme énergétique : étude du remodelage bioénergétique du cancer. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0349 . tel-01350869

HAL Id: tel-01350869

<https://theses.hal.science/tel-01350869>

Submitted on 2 Aug 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE

SPÉCIALITÉ

Sciences de la Vie

Par Emilie OBRE

**Régulation du métabolisme énergétique : Etude du
remodelage bioénergétique du cancer.**

Sous la direction de : Rodrigue ROSSIGNOL

Soutenue le 12 Décembre 2014

Membres du jury :

| | |
|--|---------------|
| Pr. ARSAC Laurent, Université de Bordeaux..... | Président |
| Pr. SONVEAUX Pierre, Université Catholique de Louvain | Rapporteur |
| Dr. KLUZA Jérôme, Université de Lille..... | Rapporteur |
| Dr. BOUZIER-SORE Anne-Karine, Université de Bordeaux | Examineur |
| Pr. RUMJANEK Flanklin David, Université Fédérale de Rio..... | Examineur |
| Dr. REZVANI Hamid Reza, Université de Bordeaux | Membre invité |
| Dr. ROSSIGNOL Rodrigue, Université de Bordeaux | Directeur |

Titre : Régulation du métabolisme énergétique : Etude du remodelage bioénergétique du cancer.

Résumé : Cette thèse étudie le remodelage métabolique des cellules cancéreuses. Trois modèles sont analysés par de nombreuses approches biochimiques et génétiques : (i) des cellules de poumon transduites avec une forme oncogénique de HRAS_{G12V}, (ii) des cellules HeLa soumises à une privation de glucose et (iii) des pièces chirurgicales de cancer du poumon. Sur chaque modèle, le remodelage métabolique observé met en jeu de nombreuses voies du catabolisme et de l'anabolisme, notamment la glutaminolyse et la biosynthèse de sérine. Ce travail révèle un rôle important des mitochondries dans ce remodelage, à la fois pour l'apport d'énergie et pour la synthèse d'antioxydants et d'acides aminés, mais aussi de phospholipides. J'ai montré l'impact étendu d'une simple mutation HRAS_{G12V} sur un très grand nombre de processus, révélant ainsi l'importance de la génétique dans le remodelage métabolique des cellules cancéreuses. Toutefois, la privation de glucose induit elle aussi un remarquable remodelage à de très nombreux niveaux, depuis l'épissage des ARN messagers jusqu'à la synthèse de sérine. Enfin, cette thèse identifie deux classes bioénergétiques de tumeurs du poumon, ouvrant de nombreuses perspectives pour le diagnostic et la compréhension de ce type de tumeurs, mais aussi pour proposer des stratégies thérapeutiques adaptées. Les résultats identifient des biomarqueurs et des cibles validées sur nos modèles *in vitro*. Les perspectives de cette thèse vont consister à la transposition de ces approches à la clinique.

Mots clés : Métabolisme énergétique, remodelage métabolique, mitochondrie, métabolisme de la sérine, glucose déprivation

Title : Regulation of energy metabolism : Study of Bioenergetics remodeling in cancer.

Abstract : This thesis investigates the metabolic remodeling of cancer cells. Three models are analyzed by different biochemical and genetic approaches: (i) lung cells transduced with oncogenic HRAS_{G12V}, (ii) HeLa cells challenged with glucose deprivation and (iii) surgical pieces of lung tumors. On each model the observed metabolic remodeling involves numerous catabolic and anabolic pathways, including glutaminolysis and serine biosynthesis. Our work revealed an important role of mitochondria in metabolic remodeling, both for the supply of energy and for the synthesis of antioxidants and amino acids, but also phospholipids. We show the extent of a single mutation HRAS_{G12V} on a very large number of metabolic processes, revealing the importance of genetics in the metabolic remodeling of cancer cells. However, glucose deprivation also induced a remarkable remodeling at many levels of cell metabolism, from the splicing of messenger RNAs to serine biosynthesis. In the third part, this thesis identified two bioenergetic classes of lung tumors, opening interesting opportunities for the diagnosis and understanding of this type of tumor, but also to propose appropriate therapeutic strategies. The results identify biomarkers and targets validated in our *in vitro* models. The outlook of this thesis will be to the implementation of these approaches in the clinic.

Keywords : Energy metabolism, bioenergetics remodeling, mitochondria, serine metabolism, glucose deprivation.

Unité de recherche

[Laboratoire Maladies rares : Génétique et métabolisme, CHU Pellegrin, 2^o étage Ecole des sages-femmes, place Amélie Raba-Léon, 33000 BORDEAUX]

A mes parents,

A mon frère,

A mon mari

REMERCIEMENT

Tout d'abord Rodrigue, mon cher directeur de thèse! Merci de m'avoir permis de faire cette thèse qui restera un super souvenir même si je t'aurai bien volontiers tordu le cou à plusieurs reprises ("Mister dernière minute et tient on pourrait rajouter ça c'est une "super idée" pas longue juste 1 mois de manip et après on arrête promis!!!"). Merci de m'avoir appris beaucoup de chose, de m'avoir amené en congrès avec toi (les bagages à l'aéroport... un grand moment!), d'avoir organiser le MIP avec toi (super souvenir on a bien rigolé), et de m'avoir soutenu... Nous formons un super binôme (méga partenaire de "ping pong") qui va continuer et vive la science!

Je tiens également à remercier les membres de mon jury. Pr.Pierre Sonveaux et Dr. Jérôme Kluza, merci de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mes travaux de thèse. Pr.Franklin Rumjanek, merci de traverser un océan pour faire parti de ce jury. Hamid et Anne-Karine merci pour votre présence tout au long de ma thèse. Laurent, merci d'être mon président de jury et de m'avoir soutenu lors de mon stage master 1... sans toi je ne soutiendrais pas cette thèse à l'heure qu'il est... Merci pour la compréhension et la gentillesse dont tu as fais preuve au vu de ma situation personnelle très délicate à ce moment là.... merci.

Merci aux membres du labo (petite Marie, grande Julie, petite Julie, Fanny T., Fanny MP., Marie-laure, Estelle, Sabine, Harmony, Christelle, Emelyne, Kelly, Pauline, Nadège, Giovanni, Isabelle, Cyril, Caroline, Patrick, Benoît...et à tous ceux que j'oublie certainement) ainsi qu' à Didier Lacombe pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire. Merci Marie pour ton écoute, ta patience, le million de commandes à passer en urgence et la tonne de services rendus! Elodie ce fût un plaisir de partager les petits déjeunés très matinaux ("c'est pas faux") et tout le reste, c'était "super green"!!! Karine, merci pour tout, pour m'avoir fait découvrir le monde de l'anesthésie (merci encore pour le congrès de la SFAR!) et pour m'avoir écouter et donner le nom d'un neurochirurgien qui a changer beaucoup de choses.

Merci également à nos collaborateurs au sein de l'université et de l'hôpital : Patrick et Guillaume merci pour les petits lipides! Hugues et Matthieu merci pour les poumons, les tableurs....Hamid, merci pour tous tes conseils et pour faire parti de mon jury, Wallid merci pour les manip de BrDu et Mohsen merci aussi et courage tu verra ça en vaut la peine! Anne-Karine merci également de faire parti des membres de mon jury ainsi que tous les week-end que tu as dû passer au labo à cause de mes manip!!!! Ben, super collab et super contente de pouvoir continuer à travailler avec toi!!!

Nivea, je vais rédiger en français comme ça tu sera obligée d'apprendre le français (ou alors tu iras sur google translate!) : merci pour ton sourire, tes câlins (tradition brésilienne!) et ton écoute. Tu es tout simplement solaire, travailler avec toi a été un réel plaisir, ne change rien reste comme tu est!!!

Caro, j'ai commencé ma thèse et toi tu la finissais... je me disais la prochaine à soutenir c'est moi, ben ca y est j'y suis.... tu as vraiment toute mon admiration pour avoir écrit

et soutenu ta thèse à 8 mois de grossesse et d'être parti en suivant sur la troisième année de médecine.... tu as tout réussi franchement chapeau madame!

Su, j'ai commencé ma thèse à tes côtés dans le même bureau, tu est partie et tu as continué à être présente à travers skype. Merci infiniment de parcourir 14440 kilomètres (et des bananes) pour voir ma soutenance, merci aussi pour tous tes protocoles et tous tes précieux conseils ainsi que nos longues discussions sur skype!

Jenn, tu as été si importante pour mon master 2, merci de m'avoir permis de passer cette étape "rock and roll" et de m'avoir présenté Rodrigue! Merci aussi pour les 100 litres de PFA, les plaques 6 puits, les pipettes... bref merci de m'avoir dépanné dès qu'il manquait quelque chose au labo le lundi matin à 8h!!! Et t'inquiète pas on continuera à aller manger les sandwichs au saumon du relais H le midi et de maudire la terre entière!! gros pensées aussi pour Annaïg et maman Armelle!

Zazou, que de chemin parcouru toutes les deux depuis notre licence. On s'est lancé dans une thèse pour moi c'est la fin, pour toi le milieu : courage continue envers et contre tout tu est la meilleure. Tu est aussi ma meilleure amie qui a toujours été là dans les bons comme dans les mauvais moments. Tu ne m'as jamais laissé tombé même à 3h du matin tu répondais présente.... merci ma chérie.

Audrey, toi aussi tu étais là à n'importe quelle heure pour moi, les mots ne suffiront jamais à te remercier toi non plus. Merci aussi pour les longueurs de piscines que tu avalais avec moi pour canaliser mon énergie et pour les bons fous rires qu'on a pu avoir ensemble!

Lucas, mon filleul, tu étais dans le ventre de maman quand j'étudiais mon cours de métabolisme... 11h devant le papier vert pomme de la maternité (on supporte plus cette couleur avec parrain depuis!)avant que tu pointes le bout de ton nez! travail bien à l'école mon petit chou c'est important!

Les copains : Alex (non c'est pas cool, c'est tastycool!), Philippe ("Super Coin-coin"), Manue (joyeux Noël Félix!), Dada (oui, on peut faire une thèse et confondre le pique et le trèfle à la bellote!), Tim (grand voisinou!), Tessa (p'tite voisinette!), Hervé (vive noir dez!) et Juju (louloutte!), Nico(vive tastycool!) et Melissa (tu vas aimer le métal avec tastycool!).... et tous ceux que j'oublie merci pour les bonnes soirées et pour avoir écouté mon oral de soutenance dont je sais que vous avez pas pipé la moitié des mots!!!!

Ludo, mon grand frère, quel bonheur ça était de grandir avec toi et que souvenirs inoubliables.... les petites voitures dans le tas de sable (désolée encore papa pour la bétonnière!), les descentes de luges à fond la caisse (et pour toutes les remontées où tu tenais la luge d'une main et moi de l'autre pour m'aider...) les parties de foot, les balades à vélo, les sorties au Conemara, les match de foot, de hockey sur glace et le fameux réveillon où j'ai rencontré mon mari... maintenant tu est à Paris et c'est pas magique car tu me manque tant...J'aurai pu ouvrir une crêperie vu la tonne que j'ai pu faire pour les mi-temps de match.... ben non j'ai fait une thèse à la place! Tu vois comme quoi les réveils avec Metallica ou System of a down peuvent mener à tout!

Papa, maman, ça y est, on y est au bout des études! Merci pour votre présence permanente à mes côtés ainsi que pour tous les sacrifices que vous avez fait pour me permettre d'en arriver là. Merci de m'avoir toujours laisser faire ce que je voulais, de m'avoir inculqué des valeurs qui font de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci aussi pour tout l'amour que vous me donnez au quotidien depuis que je suis née, moi aussi je vous aime fort. Maman, merci pour la relecture de ma thèse et pour avoir corrigé les fautes d'orthographe (le Bescherelle ne sera jamais mon ami!!) et pour toutes les heures que tu as passé à m'aider dans mes devoirs à l'école et toutes les heures à m'écouter : tu es la maman parfaite! Papa, merci de m'avoir aidé à passer des cap pas toujours facile à l'école et pour avoir toujours été mon super papa. Hé Papounet, promis ton mars géant tu l'aura un jour!!

Et enfin, un immense merci à toi mon amour, ma raison d'être. Tu es là depuis 13 ans à vivre mon rêve à travers moi, merci pour ta patience à m'attendre encore et encore. Cela n'a pas toujours été simple mais tu restais là, à m'aider à me soutenir, à calmer ma colère et à sécher mes larmes et à me redonner le sourire comme tu sais si bien le faire. De grands moments de fou rire avec tes blagues (c'est deux oiseaux qui discutent...), de bonheur (c'est quand qu'on se remarie?:))))) et tellement de bons souvenirs. Merci pour ton soutien et ton amour inconditionnel et d'avoir toujours cru en moi. Tu as été très patient et particulièrement ces derniers mois avec mon sale caractère, merci infiniment. Tout ce que je pourrais écrire ne sera jamais assez pour te dire à quel point je t'aime et que je suis heureuse d'être ta femme. Je t'aime mon ange!

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| ABBREVIATIONS | 10 |
| PREFACE | 2 |
| INTRODUCTION | 3 |
| I. Voies du métabolisme énergétique : catabolisme et anabolisme | 4 |
| 1. Compartimentation du métabolisme..... | 4 |
| a. Cytosol | 4 |
| b. Mitochondries et réseau mitochondrial | 4 |
| Composition mitochondriale..... | 6 |
| Turnover mitochondrial..... | 7 |
| 2. Glycolyse et biosynthèses associées..... | 8 |
| 3. Voie des pentoses phosphates et recyclage REDOX..... | 11 |
| a. Espèces réactives de l'oxygène (ROS) | 12 |
| 4. Cycle de Krebs et ses variantes..... | 13 |
| 5. Chaîne respiratoire et synthèse d'ATP (OXPHOS)..... | 15 |
| a. Le complexe I..... | 18 |
| b. Le complexe II..... | 18 |
| c. Le complexe III | 19 |
| d. Le complexe IV | 19 |
| e. Le complexe V | 19 |
| f. Les supercomplexes..... | 21 |
| 6. Gluconéogenèse..... | 22 |
| 7. Transporteurs mitochondriaux (famille SLC25)..... | 24 |
| 8. β-oxydation des acides gras..... | 27 |
| 9. Glutaminolyse(s)..... | 30 |
| 10. Dégradation des autres acides aminés..... | 32 |
| a. Acides aminés glucoformateurs | 33 |
| b. Acides aminés cétoogènes..... | 34 |
| c. Acides aminés glucoformateurs et cétoogènes | 34 |
| 11. Synthèse des acides gras..... | 35 |
| 12. Métabolisme de la sérine | 37 |
| II. Régulation biochimique des voies métaboliques..... | 41 |
| 1. Mécanismes moléculaires de régulation bioénergétique..... | 41 |

| | |
|--|-----------|
| 2. Mécanismes génétiques : Acétylation, méthylation, épissage et isoformes..... | 44 |
| a. Acétylation/Désacétylation | 45 |
| b. Méthylation/Déméthylation | 45 |
| c. Epissage et isoformes | 47 |
| 3. Voies de signalisation impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique :..... | 47 |
| a. AMPK..... | 47 |
| b. PI3K/AKT | 51 |
| c. RAS..... | 52 |
| d. Sirtuines..... | 54 |
| e. FoxO | 56 |
| f. HNF | 57 |
| g. HIF..... | 57 |
| h. p53 | 58 |
| i. MYC | 59 |
| III. Concepts émergents en bioénergétique | 60 |
| 1. Rigidité métabolique..... | 60 |
| 2. Flexibilité métabolique | 60 |
| 3. Remodelage ou reprogrammation métabolique | 62 |
| IV. Remodelage et flexibilité métabolique dans le cancer | 64 |
| 1. Le cancer | 64 |
| 2. L'effet Warburg : glycolyse exclusive | 66 |
| 3. Le cycle de Krebs tronqué : prédominance des voies anaplérotiques..... | 67 |
| 4. Les cancers oxydatifs (FAO)..... | 69 |
| 5. Combien de sous-types bioénergétiques de cancers (glycolytiques, oxydatifs, mixtes ?)..... | 71 |
| 6. Couplage et symbiose métabolique..... | 72 |
| 7. Oncométabolites | 73 |
| 8. Addictions métaboliques | 74 |
| V. Déterminants du remodelage métabolique dans le cancer | 74 |
| 1. Oncogènes et suppresseurs de tumeurs | 74 |
| 2. Aspects dynamiques et quantitatifs | 76 |
| 3. Driver et passenger genes..... | 77 |
| 4. Microenvironnement tumoral | 78 |
| VI. Thérapies bioénergétique du cancer | 80 |
| 1. Catalogue des approches considérées..... | 80 |
| 2. Recherche de nouvelles cibles par l'étude du remodelage | 81 |

| | |
|---|-----|
| 3. Stratégies de combinaisons de drogues | 85 |
| 4. Limitations actuelles..... | 87 |
| QUESTION BIOLOGIQUE DE LA THESE | 89 |
| ARTICLE DE REVUE..... | 91 |
| ARTICLE 1 : Soumis, confidentiel..... | 123 |
| ARTICLE 2 : Soumis, confidentiel..... | 124 |
| ARTICLE 3 : Soumis, confidentiel..... | 125 |
| DISCUSSION GENERALE..... | 126 |
| PERSPECTIVES | 150 |
| ANNEXES | 153 |
| 1 -MATERIELS ET METHODES | 154 |
| 2 -LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS ORALES..... | 168 |
| REFERENCES | 171 |
| CONCLUSION GENERALE | 197 |

ABBREVIATIONS

2-HG : 2-hydroxyglutarate

2PG : 2-phosphoglycérate

2-OGDO : 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases

3PG : 3-phosphoglycérate

6PGDH : 6-Phosphogluconate Déshydrogénase

ACC : acétyl-CoA carboxylase

ACLY : ATP-citrate lyase

ADNmt : ADN mitochondrial

ADP : Adénosine Diphosphate

AICAR : 5-aminoimidazole- 4-carboxamide-1-β-ribofuranoside)

AMP : Adénosine Monophosphate

AMPK : AMP-activated protein kinase

ANT : Adenine nucleotide translocator

ASAT : Aspartate aminotransférase

ATP : Adénosine Triphosphate

BHMT : bétaine-homocystéine méthyltransférase

CAFs : Fibroblastes associés au cancer

CaMKKβ : calmodulin-dependent kinase kinases

CoQ : Coenzyme Q

COX : cytochrome C Oxydase

CPT : Carnitine Palmitoyl Transférase

Cyt C : Cytochrome C

DHAP : Dihydroxyacétone

DNMP : DNA méthyltransférases

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FAS : Acides gras synthase

FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor

FH : Fumarate Hydratase

Fr-1,6-BP : Fructose 1,6-Bisphosphate

Fr-6-P : Fructose-6-Phosphate

G-1,3-BP : Glycéraldéhyde-1,3-Bisphosphate

G3P : Glycéraldéhyde-3-Phosphate

G6P : Glucose-6-Phosphate

G6PDH : G6P Déshydrogénase

GAPs : GTPase activating proteins

GDH : Glutamine Déshydrogénase

GDP : Guanosine DiPhosphate

GEFs : Guanosine nucleotide exchange factors

GLS : Glutaminase

GOT : Glutamate oxaloacétate transaminase

GSH : Glutathion

G-S-S-G : Glutathion oxydé

GTP : Guanosine TriPhosphate

HAT : histones acétyltransférases

HDAC : histones déacétylases

Hcy : homocysteine

HER : éléments de réponse hypoxique

HIF : Hypoxia Inducing Factor

HMT : histones méthyltransférases

HNF : Hepatocyte Nuclear Factor

IDH : Isocitrate Déshydrogénase

IGFR : Insulin-like Growth Factor Receptor

JNK : Jun N-terminal kinase

LDH : Lactate Déshydrogénase

MAT : méthionine adénosyltransférase

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MCF : Mitochondrial Carrier Family

MDH : Malate Déshydrogénase **NAD** :
Nicotinamide Adénine Dinucléotide

MEK : MAPK-ERK-Kinase

MTC : Monocarboxylate Transporter

NADP : Nicotinamide Adénine Dinucleotide
Phosphate

NRF : Nuclear Respiratory Factor

PC : Pyruvate Carboxylase

PDGFR : Platelet Derived Growth Factor
Receptor

PK : phosphatidylinositol 3-dependent
kinase

PEP : Phosphoénolpyruvate

PEPCK : Phosphoénolpyruvate
Carboxykinase

PFK : Phosphofructokinase

PHGDH : phosphoglycérate déshydrogénase

PK : Pyruvate kinase

PPP : Pentose Phosphate Pathway

PSAT1 : phosphosérine aminotransférase 1

PSPH : phosphosérine phosphatase

OAA : Oxaloacétate

OXPHOS : Oxydations Phosphorylantes

R5P : Ribose-5-Phosphate

ROS : espèces réactives de l'oxygène

SAH : S-adénosylhomocystéine

SAHH : S-adénosylhomocystéine hydrolase

SAM : S-adénosylméthionine

SDH : Succinate Déshydrogénase

SHMT : sérine hydroxyméthyltransférase

Sirt : Sirtuine

SLC : Solute Carrier

STE : Système de Transport d'Electrons

TAK 1 : TGF β -activated kinase 1

THF : tétrahydrofolate

TFAM : Transcription Factor A Mitochondrial

TIM : Translocase of the Inner mitochondrial
Membrane

TOM : Translocase of the Outer mitochondrial
Membrane

TSC2 : Tuberous sclerosis complex-2

VDAC : Voltage Dependent Anion Carrier

PREFACE

Cette thèse étudie la régulation du métabolisme énergétique dans des cellules cancéreuses humaines, afin d'identifier de nouveaux mécanismes de contrôle des voies biochimiques impliquées dans l'extraction de l'énergie présente dans les nutriments, et leur conversion en ATP, la principale forme d'énergie biologique utilisable pour les nombreux travaux cellulaires.

Le laboratoire où j'ai effectué ma thèse (EA4576MRGM ; au sein du groupe animé par le docteur R. Rossignol) a étudié de nombreux aspects de cette régulation, comme l'importance de la dynamique mitochondriale dans la modulation du flux de synthèse d'ATP, ou encore la différence d'organisation et de composition de mitochondries dans les différents tissus de l'organisme.

Dans ma thèse, j'ai abordé l'analyse du phénomène de **remodelage métabolique**, qui s'opère au niveau de la cellule, et redessine les voies du métabolisme pour permettre à la cellule cancéreuse de survivre dans des environnements génétiques ou physiques variables. Ces dernières années il est apparu que ce remodelage met en jeu une véritable reprogrammation génétique gouvernée par des facteurs de transcription et de senseurs de l'état métabolique et des besoins anaboliques, mais aussi du microenvironnement. Ce système requiert donc l'analyse des voies de signalisation impliquées dans le remodelage métabolique, comme la voie AMPK, PGC1alpha ou encore mTOR.

Pour étudier les déterminants du remodelage métabolique de cellules cancéreuses j'ai analysé trois modèles par une approche de "métabo-protéomique":

- L'activation oncogénique de HRAS dans des fibroblastes de poumon (partie 1)
- Des cellules HeLa soumises à une privation en glucose pendant 48H (partie 2)
- Des tumeurs broncho-pulmonaires et le tissu non-cancéreux adjacent, en collaboration avec le service de Chirurgie Thoracique de l'Hôpital du Haut-Lévêque (partie 3).

Les deux premières parties de cette thèse ont révélé deux nouveaux schémas de remodelage métabolique au niveau de la biosynthèse de sérine et de ses dérivés, à partir de la glutamine. Ces données suggèrent l'importance des voies anaboliques non-canoniques dans la survie des cellules cancéreuses et pourraient les désigner comme cibles thérapeutiques potentielles. La troisième partie a révélé un mésappariement métabolique entre le tissu cancéreux et le tissu sain environnant, nous amenant à proposer le concept de «métabolisme non-compétitif » pour désigner le choix opposé entre le profil métabolique tumoral et celui du tissu environnant. A l'aide d'un modèle de cellules cancéreuses et non cancéreuses en co-culture nous avons abordé l'étude de ce problème.

Les résultats présentés dans cette thèse selon trois parties présentent des expériences de protéomique, de métabolomique et de bioénergétique mais aussi de biologie moléculaire et cellulaire sur des modèles différents, qui témoignent de l'existence du phénomène de remodelage métabolique *in vitro* et *in vivo*. La discussion porte sur l'importance de ces observations pour la compréhension de la régulation du métabolisme énergétique normal et cancéreux, ainsi que pour le développement de stratégies thérapeutiques adaptées.

INTRODUCTION

Cette thèse s'intéresse à la réorganisation de nombreuses voies biochimiques du métabolisme énergétique, mais aussi de la biosynthèse et de la dégradation de certains acides aminés et autres composés (notamment taurine, cystéine et phosphatidylcholine en lien avec les résultats de la thèse). Dans l'introduction, il nous est apparu nécessaire de décrire ces voies, de manière à ce que le lecteur trouve ici les informations pré-requises à la compréhension des résultats. Les voies dites canoniques, telles que décrites dans les manuels de biochimie, sont présentées au début de l'introduction, puis les voies remaniées dans le cancer (dites non-canoniques ou alternatives) sont alors répertoriées. Un rappel des mécanismes de transduction énergétique est donné, ainsi que les avancées récentes dans la compréhension de leur régulation. Les points qui ont mérité le plus d'attention sont le métabolisme de la glutamine et de la sérine.

I. Voies du métabolisme énergétique : catabolisme et anabolisme

Nous présentons dans ce qui suit les circuits de dégradation ou de synthèse de molécules (sucres, lipides, acides aminés) qui permettent la transduction d'énergie sous forme d'adénosine triphosphate (ATP).

1. Compartimentation du métabolisme

a. Cytosol

Le cytosol est délimité par la membrane plasmique et contient les enzymes impliquées dans différentes voies de signalisation et de métabolisme. Par exemple, il abrite la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Le cytosol contient également des organites comme le noyau, le réticulum endoplasmique granuleux (REG), le réticulum endoplasmique lisse (REL), l'appareil de Golgi, les peroxysomes, les lysosomes et les mitochondries. De nombreux transporteurs sont situés sur la membrane plasmique ainsi que sur les membranes des différents organites pour assurer l'échange de métabolites, de protéines et d'ions.

b. Mitochondries et réseau mitochondrial

La mitochondrie est généralement nommée « centrale énergétique de la cellule » grâce à son rôle primordial dans la transduction d'énergie (Rolfe et Brown, 1997). Cependant, les travaux des dix dernières années montrent que cette organelle joue aussi un rôle central dans la signalisation cellulaire, les biosynthèses et la mort cellulaire. Les premières observations effectuées par microscopie électronique dans les années 50 (Palade, 1952, 1953) ont permis de décrire la mitochondrie comme une organelle ovoïde de taille moyenne comprise entre 0.5 et 1 μm de diamètre. Une membrane externe et une membrane interne délimitent deux

compartiments: l'espace inter-membranaire et la matrice. Dans les années 2000, cette description sera remplacée par le modèle de Frey et Manella, précisant l'organisation interne selon trois membranes : membrane externe, interne et membrane des crêtes (Frey et al. 2000). Dans ce modèle, les crêtes ne sont plus des invaginations de la membrane interne mais de véritables compartiments distincts, reliés par des pores de jonction à la membrane interne. Les crêtes mitochondriales sont enrichies en complexes de la chaîne respiratoire. Ainsi ce compartiment représente la zone la plus active pour la synthèse d'ATP. Toutefois, la coupe en deux dimensions observée en microscopie électronique ne donne aucune information sur l'organisation spatiale des mitochondries dans le cytosol de cellules vivantes. C'est suite à l'observation de cellules en culture par microscopie de fluorescence que Bakeeva et ses collaborateurs ont décrit les mitochondries comme un ensemble de tubules interconnectés dans le cytosol (Bakeeva et al. 1978). Cette structure complexe a pris le nom de réseau mitochondrial. Il est animé de nombreux mouvements dans les cellules vivantes mais aussi de réorganisation permanente par clivage (fission) et fusion. La balance entre fusion et fission détermine l'organisation réticulée ou fragmentée (Cerveny et al., 2007; Hales, 2004). Ce réseau est formé de plus ou moins longs tubules, selon le statut énergétique de la cellule (Benard et al. 2007; Frey et al. 2000; Youle et Karbowski 2005). Ainsi, des cellules où les mitochondries sont dépolarisées possèdent un réseau ponctué, alors qu'en condition basale, le réseau est davantage tubulaire. Toutefois, cette vision reste simpliste et le lien entre l'état énergétique mitochondrial et sa forme reste à clarifier. Le réseau mitochondrial s'étend dans le cytosol et entre en contact avec le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et le cytosquelette (Amchenkova AA, Bakeeva LE, Chentsov YS, Skulachev VP 1988; Benard, Gi, Bellance et al. 2007; Szabadkai, Simoni, and Rizzuto 2003). Chez les mammifères, la fusion des mitochondries est réalisée par l'intermédiaire de la mitofusine 2 et OPA1 (dynamamin-related guanosine triphosphatase mutated in dominant optic atrophy), alors que la fission s'opère principalement par Drp1 (dynamamin-related protein 1) et Mff. Récemment, les laboratoires de David Chan et de Thomas Langer ont révélé le rôle des isoformes courtes de OPA1 dans la dynamique du réseau mitochondrial (Anand et al., 2014; Mishra et al., 2014). Les processus de fusion et de fission sont régulés et coordonnés selon différents stades de la cellule, notamment la croissance, la mitose et l'apoptose (Cerveny et al., 2007). Il est intéressant de noter que le déplacement des mitochondries dans l'axone d'un neurone se fait conjointement aux phénomènes de fusion et de fission, permettant potentiellement aux mitochondries de se rendre là où l'énergie est davantage nécessaire (Hollenbeck and Saxton, 2005). Dans les cellules cancéreuses, quelques études suggèrent une altération de la

dynamique mitochondriale, avec une surexpression de la protéine de fission DRP1 (Inoue-Yamauchi and Oda, 2012; Zhang et al., 2013; Zhao et al., 2013) mais trop peu d'études ont encore été consacrées à cet aspect.

Composition mitochondriale

Les principales macromolécules qui composent la mitochondrie sont des acides nucléiques, des lipides et des protéines. Leur proportion relative varie d'un tissu à l'autre selon la demande énergétique nécessaire aux fonctions physiologiques. Les lipides peuvent être importés dans la mitochondrie ou générés en son sein et se retrouvent dans la composition des membranes interne et externe. La membrane externe mitochondriale est une bicouche lipidique composée d'environ 50 % de protéines et de 50% de lipides. Elle est perméable aux petites molécules de moins de 10 kDa (anions, cations, pyruvate, acides gras et nucléotides...) dont le passage s'effectue par l'intermédiaire de la porine ou VDAC (Voltage Dependent Anion Carrier, isoformes 1-3). Les protéines mitochondriales codées par l'ADN nucléaire possèdent une séquence d'adressage qui leur permet de rejoindre leur compartiment par l'intermédiaire du système d'import, le TOM (Translocase of the Outer Membrane). La composition de la membrane interne mitochondriale diffère des autres membranes biologiques. Elle contient environ 80 % de protéines et seulement 20 % de phospholipides. A cause de sa composition lipidique particulière, cette membrane est imperméable aux ions et le passage de molécules nécessite la présence de transporteurs réunis dans la famille des transporteurs mitochondriaux SLC25 (Cf. Chapitre I.7). Les protéines sont importées grâce à un système complexe de translocases, les TIM (Translocase of the Inner Membrane) et les TOM. Cette thèse aborde plus particulièrement le rôle de deux transporteurs mitochondriaux impliqués dans le remodelage métabolique (SLC25A12 dans la partie 1 sur HRAS et XXXX dans la partie 2 sur l'aglycémie).

Le **SCL25A12** encore appelé Aralar1 ou AGC1 est un échangeur glutamate/aspartate. Il compose la navette malate/aspartate (Cf. Chapitre I.7) mais il intervient également dans le métabolisme de la glutamine (Cf. Chapitre I.9). Le **XXXX** (mitochondrial carrier homologue 2) est décrit comme un transporteur "orthodoxe" : il serait localisé à la membrane externe, ne transporterait aucun métabolite et servirait plutôt d'ancrage à tBid, un régulateur de l'apoptose (Zaltsman et al., 2010). Nous verrons dans la partie 2 que nos données sont en contradiction avec ces observations. Des données suggèrent pourtant que le XXXX intervient

aussi dans le métabolisme. Les souris KO XXXX dans le foie montrent une augmentation de la β -oxydation des acides gras. De plus une étude génétique a montré une augmentation de XXXX chez les femmes obèses (Kulyté et al., 2011a). XXXX est un marqueur de l'obésité mais aussi un facteur prédictif dans le risque de cancer de l'utérus. Dans le cadre de cette thèse, nous allons nous intéresser plus particulièrement à un nouveau rôle de XXXX en tant que transporteur en lien avec le métabolisme et le cancer.

La mitochondrie contient aussi son propre ADN, dépourvu d'histone et d'intron, et organisé sous forme de nucléoïdes dans la matrice mitochondriale. L'ADN mitochondrial (ADNmt) humain existe sous la forme d'un double brin circulaire de 16568 paires de bases. Il est présent en plusieurs milliers de copies par cellule. L'ADNmt code 22 ARNt, les sous-unités 12S et 16S d'ARNr et 13 polypeptides qui constituent avec les 74 polypeptides codés par l'ADN nucléaire, les complexes enzymatiques du système de transport des électrons. La boucle régulatrice de l'ADNmt (boucle D) est une séquence non codante, constituée de trois brins d'environ 600 paires de bases. Cette région contient les promoteurs des brins légers et lourds, ainsi que l'origine de réplication du brin lourd. L'ADNmt présente un taux de mutation 10 à 17 fois supérieur à celui de l'ADN nucléaire (Neckelmann et al., 1987) puisqu'il n'est pas protégé par des histones et qu'il est proche des zones de production de radicaux libres. L'ADNmt possède son propre système de réplication, de transcription et de traduction.

Turnover mitochondrial

Le contenu mitochondrial cellulaire peut être ajusté pour adapter la capacité de production d'énergie à la demande physiologique ou pathologique. La quantité de mitochondries, ou plutôt le volume du réseau mitochondrial à l'état stationnaire est le résultat de la balance entre deux processus : la biogénèse et la dégradation.

La biogénèse mitochondriale fait intervenir l'expression de gènes appartenant aux génomes nucléaire et mitochondrial (Hood et al., 2006). L'activation de la biogénèse fait intervenir différents facteurs de transcription. Les facteurs NRF (Nuclear Respiratory Factor) 1 et 2 sont les principaux facteurs de transcription nucléaire qui induisent l'activation de la transcription des gènes codant des protéines mitochondriales. NRF1 et NRF2 activent la transcription de TFAM (Transcription Factor A, Mitochondrial) qui se fixe à l'ADNmt pour induire la transcription. Enfin, PGC1-alpha, un co-activateur de la biogénèse mitochondriale

est lié au métabolisme énergétique dans les cellules musculaires (Jose et al., 2013a; Lin et al., 2002; Wu et al., 1999).

Pour maintenir l'efficacité de cette machinerie complexe de transduction énergétique, la mitochondrie, un système de contrôle-qualité existe pour les prendre en charge. Les mitochondries sont éliminées par une forme sélective d'autophagie, la mitophagie. Trois mécanismes de régulation de la mitophagie ont été identifiés : le premier a été caractérisé dans la levure et implique les protéines atg32 et Uth1 (Kissová et al., 2004; Okamoto et al., 2009). Le deuxième mécanisme a été élucidé dans la maturation des érythrocytes et implique Nix (ou Bnip3l) et LC3 (Novak et al., 2010; Sandoval et al., 2008). Le dernier mécanisme trouvé dans la maladie de Parkinson fait appel à la parkine et à PINK1 (Narendra et al., 2008)(Shiba-Fukushima et al., 2012). Ce mécanisme est en lien direct avec le métabolisme énergétique car la parkine est recrutée par la mitochondrie lorsque le potentiel électrique transmembranaire chute, comme en présence d'un découplant. Une étude récente de notre laboratoire montre un lien entre la stimulation du métabolisme énergétique mitochondrial et la mitophagie. En effet, nous avons montré que Rheb (qui est une petite protéine GTPase impliqué dans le voie de signalisation AMPK-mTOR (cf. Chapitre II.3.a) est recrutée à la membrane externe de la mitochondrie lorsqu'il y a une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale (Cf. Chapitre I. 5). La translocation de Rheb à la mitochondrie entraîne une interaction entre Nix (récepteur autophagique mitochondrial) et LC3-II (protéine de l'autophagosome) aboutissant à la mitophagie. Dans ce cas, la mitophagie évite l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles (Melser et al., 2013).

2. Glycolyse et biosynthèses associées

La glycolyse permet la dégradation progressive du glucose pour produire l'énergie cellulaire sous forme d'ATP en absence d'oxygène. Au niveau de la glycolyse, il existe des branchements qui redirigent les métabolites intermédiaires vers les voies d'anabolisme. Ainsi, le glucose- 6-phosphate (G6P) alimente la voie des pentoses phosphates (Boren et al., 2001), le 3-Phosphoglycérate (3PG) permet la biosynthèse de sérine, et le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) sert à la synthèse d'acides gras. Le pyruvate, produit final de la glycolyse, peut être utilisé par la lactate déshydrogénase (LDH) ou par la pyruvate déshydrogénase (PDH) puis par le cycle de Krebs. La glycolyse a été étudiée par des biochimistes allemands, Otto Warburg, G. Embden et O. Meyerhof. Elle a lieu dans le cytosol et se divise en deux phases (**Figure 1**) :

- ❖ Première phase: elle comprend les cinq premières réactions et permet la transformation d'une molécule de glucose en deux molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) en consommant deux molécules d'ATP.
- ❖ Deuxième phase: elle est composée des cinq réactions suivantes qui convertissent les deux molécules de glycéraldéhyde-3-phosphate en deux molécules de pyruvate, le tout en produisant quatre molécules d'ATP.

La glycolyse permet une production rapide d'ATP mais en quantité limitée puisque celle-ci ne produit que 2 molécules d'ATP par molécule de glucose (Ganapathy-Kanniappan and Geschwind, 2013).

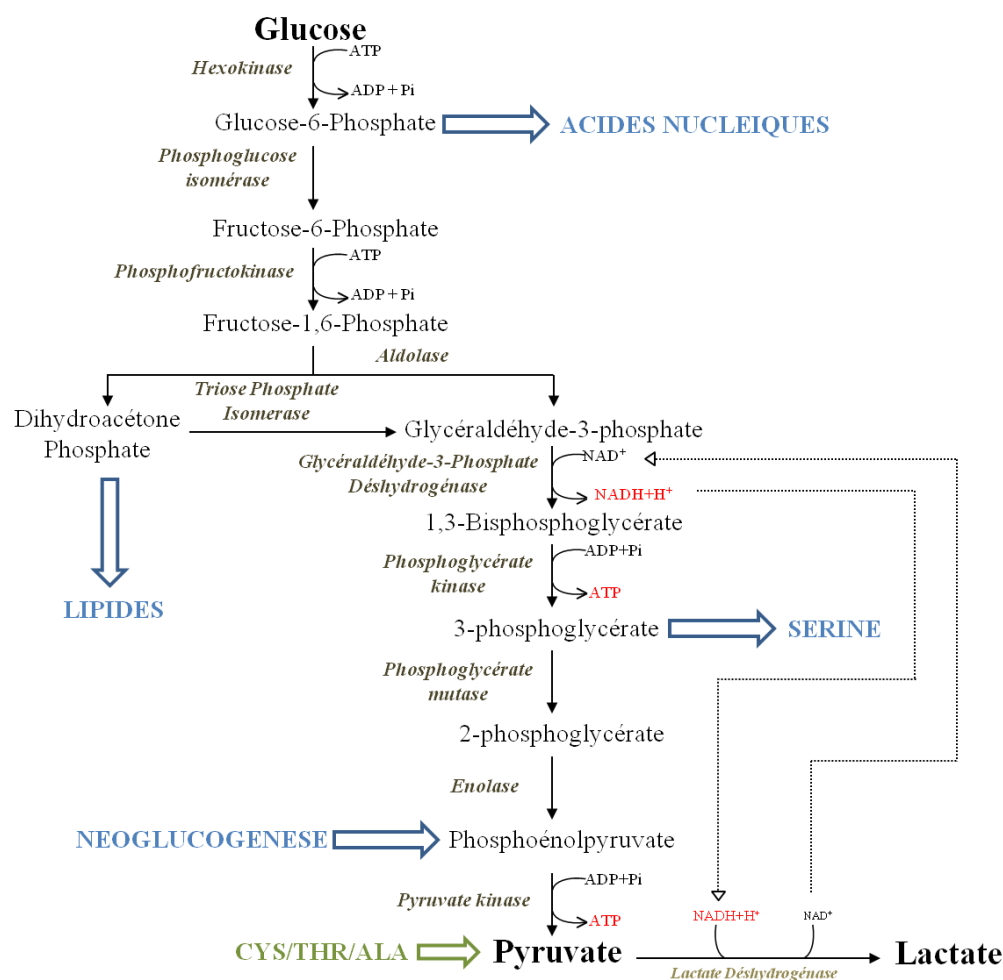


Figure 1 : La glycolyse. Voie du catabolisme qui permet la dégradation d'une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate. Elle produit 2 molécules d'ATP et des intermédiaires métaboliques pour les voies de l'anabolisme . Cystéine (CYS), thréonine (THR), alanine (ALA).

La première réaction consiste en une phosphorylation du glucose sur son carbone 6. Deux enzymes peuvent catalyser cette réaction: l'hexokinase et la glucokinase. L'hexokinase est très active à une concentration de glucose sanguin normale (environ 4 mM). Elle peut être inhibée par le G6P. La glucokinase quant à elle est située dans le foie. Elle devient plus active lorsque la concentration sanguine de glucose est élevée. A l'inverse de l'hexokinase, elle n'est pas inhibée par le produit de sa réaction. La glucokinase est également une enzyme inductible c'est-à-dire que sa concentration est régulée par l'insuline. Lors d'un diabète, l'insuline n'est plus assez produite et la concentration de glucokinase diminue. Ainsi la concentration de glucose dans le sang reste anormalement élevée (Agius and Stubbs, 2000; Iynedjian, 1993).

Le glucose-6-Phosphate (G6P) est alors formé pour poursuivre la glycolyse ou alors être métabolisé dans la voie des pentoses phosphates (PPP) détaillée plus bas (Cf. Chapitre I.3) (Patra and Hay, 2014). La deuxième réaction est la transformation du G6P en Fructose-6-phosphate (Fr-6-P) par la glucose-6-phosphate isomérase (ou phosphoglucose isomérase). En consommant de l'ATP, le Fr-6-P devient du Fructose-1,6-bisphosphate (Fr-1,6-BP) par la phosphofructokinase (PFK). C'est l'enzyme la plus régulée de la glycolyse. Elle est, entre autre, inhibée par une forte concentration d'ATP ou de citrate. A l'inverse, cette enzyme est stimulée par une forte concentration d'AMP (Moreno-Sánchez et al., 2012). La réaction suivante fait appel à l'aldolase qui forme deux trioses phosphates: le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P). Le DHAP peut être utilisé pour la voie de synthèse des lipides car il permet la formation de glycérol-3-phosphate qui est un composé nécessaire à la formation des acides gras (Das et al., 2006; Hajra, 1996). Toutefois, le DHAP est majoritairement converti en G3P par l'enzyme triose-phosphate isomérase, car seul le G3P sera utilisé dans la deuxième phase de la glycolyse. Cette deuxième phase de la glycolyse débute par l'oxydation du G3P en glycéraldéhyde-1,3-Bisphosphate (G-1,3-BP) par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) avec une réduction du NAD^+ en NADH. Le groupement phosphate du G-1,3-BP est par la suite transféré à l'ADP pour former une molécule d'ATP et une molécule de 3-phosphoglycérate (3PG). Ceci est permis grâce à la phosphoglycérate kinase (PGK). Le 3PG se situe à un carrefour métabolique. Il peut soit participer à la voie de biosynthèse de la sérine (Cf. Chapitre I.12), soit poursuivre la glycolyse. Dans ce cas, le 3PG est converti en 2-phosphoglycérate (2PG) par la phosphoglycérate mutase. L'énolase va permettre la formation du phosphoénolpyruvate (PEP) à partir de la déshydratation du 2PG. Le PEP peut également servir dans d'autres voies de l'anabolisme (Cf. chapitre I.6). La dernière réaction de la glycolyse permet la formation des deux dernières

molécules d'ATP. Le groupe phosphoryl du PEP est transféré à l'ADP pour former l'ATP et le pyruvate. Cette réaction est catalysée par la pyruvate kinase (PK) qui est la deuxième enzyme la plus régulée de la glycolyse. Elle est inhibée par l'ATP, l'acétyl-CoA, l'alanine, mais elle est activée par l'AMP et le Fr-1,6-BP. La PK existe sous 4 formes : L, R, M1 et M2. PKL est exprimée dans le foie et les reins, PKR dans les érythrocytes, PKM1 est la forme majoritaire et ubiquitaire tandis que la forme PKM2 est embryonnaire. La PKM2 est également surexprimée dans le cas de nombreux cancer (Gupta and Bamezai, 2010) (cf. chapitre IV). Le pyruvate produit peut alors être transformé par différentes voies en fonction de la quantité d'oxygène. En absence d'oxygène il est transformé en lactate par l'enzyme lactate déshydrogénase. Les cinq isoenzymes de la LDH sont une combinaison tétramérique de deux sous-unités différentes : A (ou M pour muscle), et B (ou H pour heart). Par exemple, la LDHA est constitué de 4 sous-unités A alors que la LDH2 est composé de deux-sous-unité A et de deux sous-unité B (Miao et al., 2013).

En présence d'oxygène, le pyruvate est oxydé par le cycle de Krebs afin de produire plus d'énergie.

3. Voie des pentoses phosphates et recyclage REDOX

Les cellules ont besoin de NADPH pour la synthèse des acides gras (Cf. chapitre I.11) et pour se protéger contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Patra and Hay, 2014). La voie des pentoses phosphates (PPP) permet la régénération de 70% du NADPH et la production du ribose-5-phosphate (R5P) indispensable à la synthèse d'acides nucléiques. La PPP se branche sur la glycolyse au niveau du G6P (**Figure 2**). La PPP est composée de deux branches (**Figure 2**) :

- ❖ Branche oxydative, irréversible : Le G6P subit deux oxydations successives par la G6P déshydrogénase (G6PDH) et la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGDH) ce qui aboutit à la régénération de 2 NADPH et à la formation de CO₂ et de ribulose-5-phosphate.
- ❖ Branche non oxydative, réversible : Au final, cinq réactions produisent divers oses comme par exemple le R5P essentiel à la synthèse d'acides nucléiques, et de deux composés de la voie de la glycolyse le fructose-6-phosphate et le glycéraldéhyde-3-phosphate. (Tong et al., 2009).

Réaction de détoxification des ROS

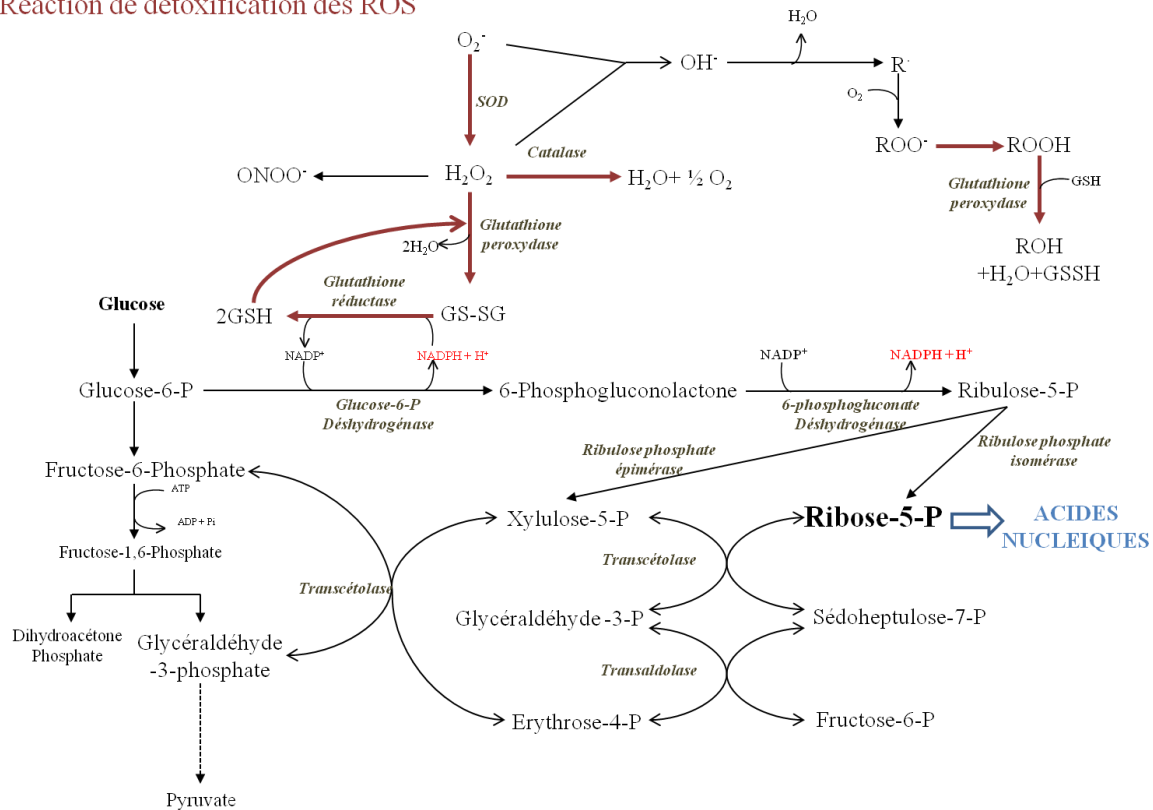


Figure 2 : Voie des Pentoses-Phosphates. Elle permet la formation de ribose-5-phosphate à partir d'un intermédiaire de la glycolyse le glucose-6-phosphate (G3P) et la production de NADPH nécessaire aux réactions de détoxification des ROS. Ion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), radical hydroxyle (OH^{\bullet}), ion hydroxyle (OH^-), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

La première étape de la branche oxydative, catalysée par l'enzyme Glucose-6-phosphate déshydrogénase, est irréversible et contrôle fortement le flux dans la voie: le facteur régulateur le plus important est la concentration du $NADP^+$, le NADPH, lui, est l'inhibiteur compétitif de la G6PDH. Le 3PG est quand à lui un inhibiteur de la 6PGDH puisque le 3PG est formé à partir du G3P qui peut provenir de la glycolyse et de la voie des PPP (Patra and Hay, 2014).

a. Espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les ROS sont impliqués dans plusieurs processus pathologiques à savoir le cancer, les maladies inflammatoires, le vieillissement, etc. Les ROS désignent l'ion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), l'ion hydroxyle (OH^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les ROS peuvent être produit par les complexes de la chaîne respiratoire mais aussi par les NADPH-

oxydases (NOX). Les ROS stimulent la croissance cellulaire mais peuvent aussi être toxiques selon leur concentration. La cellule dispose de plusieurs mécanismes de protection contre les effets de ces composés, notamment des enzymes de réduction des peroxydes nécessitant la présence de NADPH pour une détoxification. Par exemple (Figure 2), la décomposition du peroxyde d'hydrogène par la glutathion peroxydase en présence du glutathion réduit (G-SH) forme une molécule d'eau et le glutathion oxydé (G-S-S-G), réduit à son tour par les électrons du NADPH en présence de glutathion réductase (Cosentino et al., 2011).

Dans cette thèse, nous avons choisi de ne pas étudier la biologie des ROS car cela constitue le sujet de recherche d'un autre membre du laboratoire, à partir des modèles que j'ai plutôt analysé sur le plan du métabolisme et de sa reprogrammation.

4. Cycle de Krebs et ses variantes

C'est Hans Krebs qui a su rassembler des travaux sur plusieurs années, nous permettant ainsi d'avoir une meilleure compréhension du cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique) qui aboutit à une oxydation complète du pyruvate (Stobbe et al., 2012). Le pyruvate est à l'origine de la plus grande part de production de l'acétyl-CoA entrant dans le cycle de Krebs (**Figure 3**). Le complexe enzymatique « pyruvate déshydrogénase (PDH) » catalyse la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA. La PDH peut être inhibée par la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK). La première réaction propre au cycle est réalisée par la citrate synthase qui convertit l'acétyl-CoA associé à l'oxaloacétate en citrate. Cette réaction s'accompagne d'une réduction du NAD^+ et de la formation d'une molécule de CO_2 . Cette enzyme est très régulée, entre autre, par le NADH et le succinyl-CoA qui l'inhibe. Le citrate est exporté hors de la mitochondrie via son transporteur (SLC25A1) et sert aussi à la synthèse des lipides (Cf. Chapitre I.11). L'aconitase catalyse la synthèse d'isocitrate à partir du citrate. L'isocitrate subit ainsi une décarboxylation oxydative par l'isocitrate déshydrogénase permettant la formation d' α -cétoglutarate. Du NADH est également synthétisé par réduction du NAD^+ (Stobbe et al., 2012). Ce NADH va ensuite être transféré à la chaîne de transport des électrons faisant ainsi de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) la première enzyme reliant le cycle de Krebs à la chaîne respiratoire. Il existe trois isoformes de l'IDH: IDH1 (cytosolique) et IDH2 et IDH3 (mitochondriales). L'IDH2 utilise du NADPH alors que l'IDH3 fonctionne avec le NADH. Cette enzyme est également située à un carrefour entre le cycle de Krebs et le métabolisme des acides aminés puisque l' α -cétoglutarate joue un rôle important dans les

réactions catalysées par les amino-transférases. En effet, l' α -cétoglutarate peut aussi être synthétisé à partir de la glutamine qui donne alors du glutamate. Ce glutamate par déamination va former l' α -cétoglutarate. L'IDH (isoformes 1 et 2) est mutée dans certains cancers comme les gliomes (Kos et al., 2009), les leucémies (Mardis et al., 2009) ou les chondrosarcomes (Amary et al., 2011) mais aussi certains mélanomes. Des mutations de l'IDH entraînent la formation d'un oncométabolite, le 2-hydroxyglutarate (2-HG), à partir de l' α -cétoglutarate. Le 2-HG est un analogue l' α -cétoglutarate qui permet alors de stabiliser le facteur HIF1 α . Celui-ci a notamment pour rôle de stimuler la glycolyse, l'angiogenèse et la croissance cellulaire. J'expliquerai plus en détail le rôle de ce facteur dans le chapitre II.3. L' α -cétoglutarate déshydrogénase forme le succinyl-CoA avec une réduction du NAD^+ en NADH. En transformant le succinyl-CoA en succinate, la succinyl-CoA synthétase permet la production d'une molécule de GTP. La succinate déshydrogénase oxyde le succinate en fumarate tout en synthétisant une molécule de FADH_2 . La succinate déshydrogénase fournit ainsi le FADH_2 nécessaire à la chaîne respiratoire au niveau du complexe II. En effet, la succinate déshydrogénase est liée à la membrane interne de la mitochondrie et c'est la seule enzyme du cycle de Krebs à faire partie intégrante de la chaîne respiratoire. La fumarate hydratase (FH) permet la synthèse du malate à partir du fumarate. La dernière étape du cycle de Krebs fait intervenir la malate déshydrogénase qui transforme le malate en oxaloacétate. Cette réaction est accompagnée par la réduction du NAD^+ (Stobbe et al., 2012).

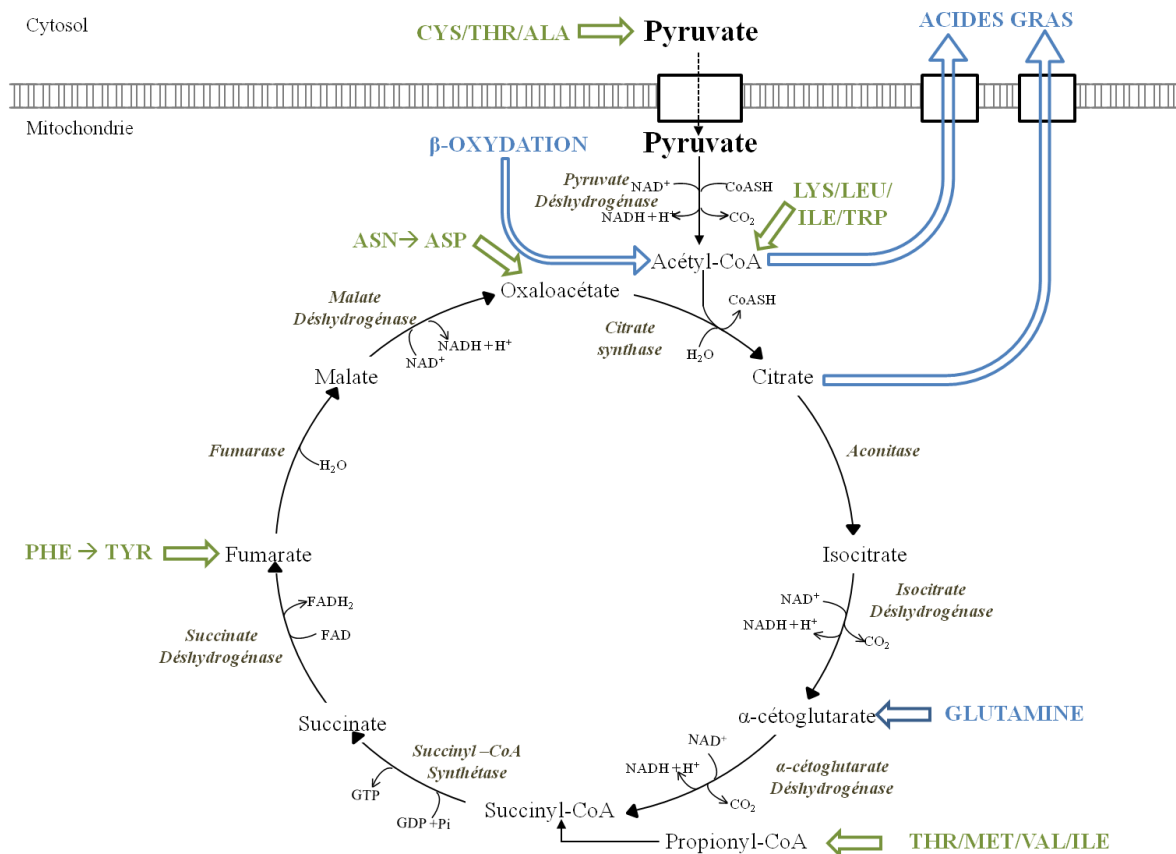


Figure 3 : Cycle de Krebs. Il permet l'oxydation du pyruvate mais aussi de substrats anaplérotiques permettant ainsi la production de NADH et de FADH₂ nécessaire au fonctionnement de la chaîne respiratoire. Il forme l'acétyl-CoA et le citrate qui sont des intermédiaires à la synthèse d'acides gras. Asparagine (ASN), aspartate (ASP), lysine (LYS), leucine (LEU), isoleucine (ILE) tryptophane (TRP), méthionine (MET), valine (VAL), phénylalanine (PHE), tyrosine (TYR).

Des mutations de la SDH ont été trouvées dans des paragangliomes de la tête et du cou (Baysal, 2000). Des mutations ont également été observées dans la FH dans le cancer de l'utérus, du sein et du rein (Tomlinson et al., 2002). Ces mutations entraînent une accumulation de succinate ou de fumarate qui sont des inhibiteurs des prolyl-hydroxylases. Cette inhibition a pour conséquence la stabilisation du facteur de transcription HIF1 α (Cf. Chapitre II.3) et l'activation d'un métabolisme plutôt glycolytique (Dhup et al., 2012a).

5. Chaîne respiratoire et synthèse d'ATP (OXPHOS)

Les électrons libérés lors des réactions d'oxydations sont transférés à un système de transport d'électrons (STE) jusqu'à un accepteur final qui est l'oxygène moléculaire O₂. Ce transfert d'électron est couplé à l'extrusion de protons vers l'espace inter-membranaire ce qui

génère un gradient de proton (gradient chimique) mais aussi une différence de charges (gradient électrique) transmembranaires. Cela génère ainsi un gradient électrochimique qui contient les deux composantes précitées. Ce gradient représente une forme d'énergie utilisée pour la synthèse d'ATP. Le couplage de la respiration à la synthèse d'ATP porte le nom d'oxydations phosphorylantes (OXPHOS) (**Figure 4**).

Les OXPHOS débutent avec l'entrée des électrons dans le STE au niveau des complexes I ou II. Les électrons entrent par le complexe I lors de l'oxydation du NADH, ou de FADH₂ via le complexe II, et sont transférés à l'ubiquinone. La glycérol-3-phosphate déshydrogénase et l'ETF (électron-transfert-flavoprotéine) transfèrent également des électrons à l'ubiquinone. Ensuite, le complexe III transfère les électrons de l'ubiquinone réduite au cytochrome c. Le complexe IV complète la séquence en transférant les électrons du cytochrome c à l'oxygène. Ce transport des électrons est couplé à une translocation de protons, à travers la membrane mitochondriale interne, vers l'espace intermembranaire. Ce gradient de protons constitue une réserve d'énergie qui est finalement utilisée par le complexe V pour produire l'ATP. Chez l'homme, la plus grande partie de l'énergie utilisée par les cellules est produite via les oxydations phosphorylantes. D'ailleurs, une personne normale produit environ 65 kg d'ATP quotidiennement (Rich, 2003).

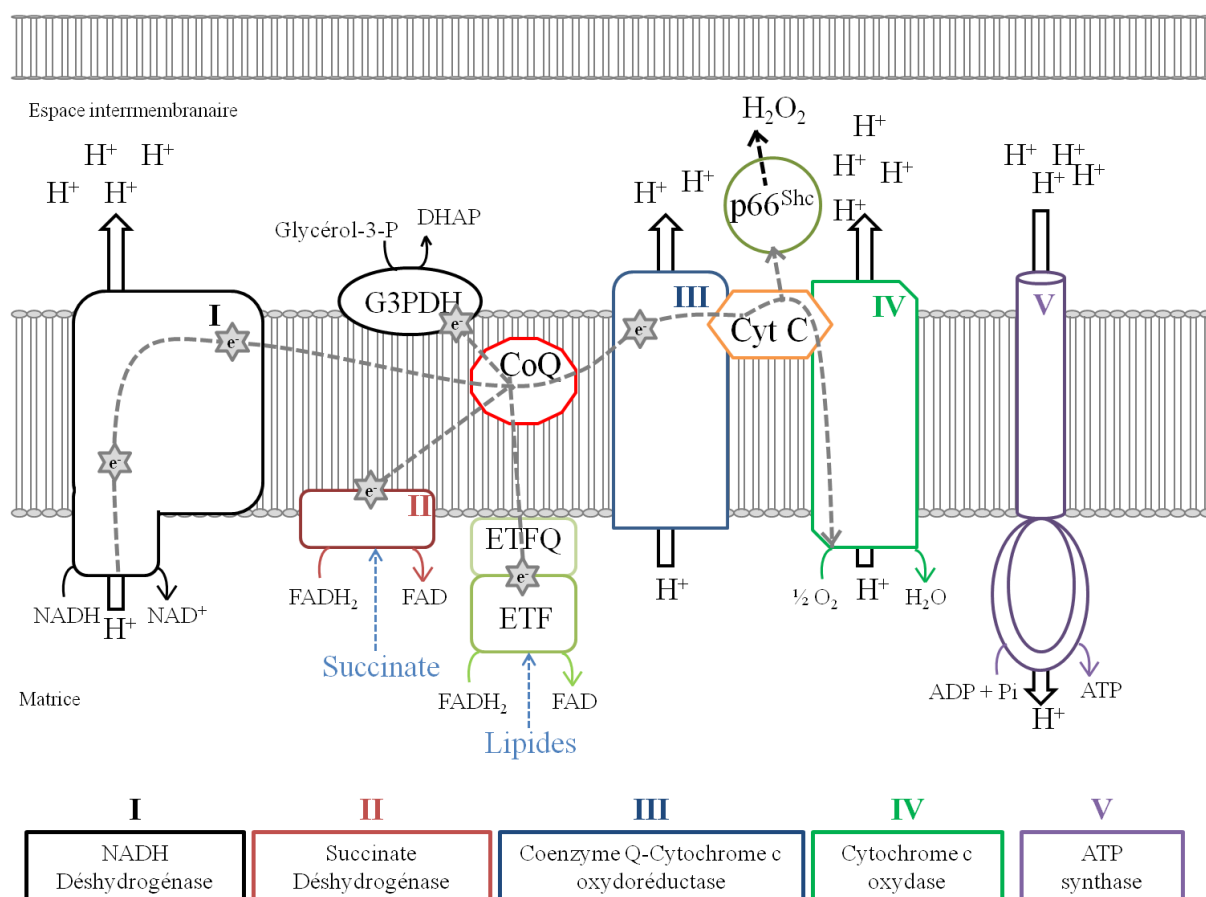


Figure 4 : Système des oxydations phosphorylantes (OXPHOS). Le système de transport des électrons est composé des 5 complexes de la chaîne respiratoire, de l'ETF et de la G3PDH qui permettent le transfert d'électron jusqu'à l'oxygène. Les complexes I, III et IV transfèrent des protons dans l'espace inter-membranaire. Ces protons passent alors à travers le complexe V qui grâce à la force proton-motrice génère l'ATP. Coenzyme Q (CoQ), glycéról-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH), ETF (électron-transfert flavoprotéine), cytochrome c (cyt c)

Le transport de protons dans le mécanisme de couplage entre les réactions d'oxydoréduction et la phosphorylation a été décrit sous le nom de théorie chimio-osmotique de MITCHELL, (Mitchell P., 1961), pour laquelle il a reçu le prix Nobel en 1978. Ce transfert des électrons est notamment possible grâce aux potentiels standards d'oxydo-reduction croissants. La translocation de protons crée un potentiel électrochimique de protons ($\Delta\mu_{H^+}$) de part et d'autre de la membrane interne car celle-ci possède une faible perméabilité aux protons. On appelle ce gradient la force proton-motrice (Δp), constituée d'un gradient de charges ($\Delta\Psi_m$) et d'un gradient chimique (ΔpH) où Δp (mV) = $\Delta\Psi_m - 59 \Delta pH$. L'ATP synthase transforme une partie de cette réserve d'énergie électrochimique en ATP, en utilisant 4 protons pour produire 1 ATP. Le gradient de protons n'est cependant pas seulement

essentiel pour la production d'ATP, il est nécessaire à l'import des protéines dans la membrane interne et la matrice mitochondriale (Geissler et al., 2000; Schleyer et al., 1982).

a. Le complexe I

La NADH-coenzyme Q réductase transporte les électrons du NADH à l'ubiquinone, aussi appelé coenzyme Q (CoQ), tout en transférant quatre protons dans l'espace inter-membranaire. Le complexe I est le plus gros complexe du système de transport des électrons avec 46 sous-unités, pour une taille totale d'environ 1000 kDa (Remacle et al., 2008). Chez les mammifères, 14 sous-unités sont considérées comme essentielles à son activité catalytique (Hirst et al., 2003; Remacle et al., 2008). Les autres sous-unités jouent probablement un rôle dans la régulation et l'assemblage de ce complexe (Fredrich et al., 1994).

b. Le complexe II

La succinate-coenzyme Q réductase transfère les électrons du FADH_2 à l'ubiquinone. Cette enzyme fait partie du cycle de Krebs tout en étant liée à la membrane interne mitochondriale. Ce complexe ne transfère pas de protons dans l'espace inter-membranaire. Les complexes I et II constituent les principaux points d'entrée des électrons dans le STE. Néanmoins, il existe d'autres voies d'entrée pour les électrons, telles que la flavoprotéine de transfert des électrons-ubiquinone oxydoréductase (ETF-QO) et la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH) (Watmough and Frerman, 2010). Toutes ces enzymes réduisent donc l'ubiquinone (ou Coenzyme Q). Cette molécule joue un rôle clé dans le STE en liant les différentes voies d'entrée des électrons aux autres complexes du STE. Erich Gnaiger propose le terme de 'Q-junction'. Le coenzyme Q peut être présent sous trois formes différentes : (i) la forme réduite (QH_2), aussi appelée ubiquinol, (ii) la forme oxydée (Q), nommée ubiquinone et (iii) la forme intermédiaire, le radical ubisemiquinone (Q^\cdot) (Mulikidjanian, 2005). Des défauts d'activité du complexe II ont été corrélés au développement de pathologies neurodégénératives telles que l'ataxie de Friedrich (Rötig et al. 1997) ou la maladie de Huntington (Butterworth et al. 1985). Une dysfonction du complexe II due à des mutations, peut causer des cancers spécifiques comme des paragangliomes (Hoekstra and Bayley, 2013). De même, une diminution de l'activité du complexe II a été associée à une augmentation de la prolifération cellulaire associée à la formation de tumeurs (Gimenez-Roqueplo et al., 2001).

via l'activation du facteur HIF1alpha responsable de l'augmentation de la glycolyse et de l'angiogenèse dans les tumeurs.

c. Le complexe III

La coenzyme Q-cytochrome c réductase qui est aussi appelée complexe III, transfère les électrons du CoQ au cytochrome (cyt c), tout en participant à l'élaboration du gradient de protons. Ce complexe est un dimère formé de deux monomères constitués de 11 sous-unités où seul le cyt b est codé par l'ADNmt. Entre les complexes III et IV, le cyt c peut être oxydé par p66^{shc} qui peut dévier une partie des électrons du STE pour produire des ROS sous forme de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Giorgio et al., 2005).

d. Le complexe IV

La cytochrome c oxydase (COX), l'enzyme terminale du STE, transfère les électrons du cytochrome c réduit à l'accepteur final des électrons, l'oxygène, tout en contribuant à la force proton-motrice. La réduction de l'O₂ en H₂O nécessite quatre électrons. Chez les mammifères, la COX est composée de 13 sous-unités dont trois sont codées par l'ADNmt (les sous-unités I, II et III). Ces sous-unités contiennent les cytochromes a et a₃ ainsi que les ions cuivres CuA et CuB (Mills et al., 2003). Le complexe IV est aussi très intéressant car il pourrait constituer un second mécanisme de contrôle respiratoire, avec la force proton-motrice. Ce mécanisme serait basé sur l'inhibition allostérique (indépendante du potentiel de membranaire mitochondrial) de la COX par fixation d'ATP (Arnold and Kadenbach, 1997). En fait, l'ATP peut se lier au niveau de la sous-unité IV du côté matriciel lorsque le ratio ATP/ADP est élevé. Ce phénomène permettrait donc d'ajuster la production énergétique à la demande physiologique.

e. Le complexe V

L'ATP synthase utilise la force proton-motrice afin de produire l'ATP à partir de l'ADP. Ainsi, ce complexe enzymatique constitue la dernière étape des OXPHOS. On peut diviser ce complexe en trois: la partie catalytique (F₁) se situant du côté matriciel, la partie membranaire constituant le canal (F₀), ainsi que les deux bras connecteurs, le périphérique et le central (Arnold et al., 1998). Le secteur F₁ constitue le rotor qui catalyse la production d'ATP. Cette partie est constituée de 5 sous-unités: α₃, β₃, γ, δ, et ε. Le sous complexe F₁ est capable d'hydrolyser l'ATP mais requiert la présence de F₀ pour synthétiser l'ATP. Le

secteur F_0 constitue le stator, qui assure la connexion entre le domaine catalytique et les composantes hydrophobes du complexe, jouant le rôle d'un canal à protons. Ce secteur est formé de 10 sous-unités (Collinson, 1994a, 1994b). L'indice o indique que c'est cette partie du complexe qui donne la sensibilité du complexe V à l'oligomycine, un puissant inhibiteur du complexe V et de la respiration couplée mitochondriale (McCarty, 1992). Une petite protéine de 10 kDa peut aussi se lier au secteur F_1 et inhiber l'hydrolyse de l'ATP par ce complexe. Cette protéine, nommée IF_1 , participe à la formation des dimères de l'ATP synthase (García et al., 2006). Le mécanisme catalytique fait intervenir des changements conformationnels de la partie F_1 , qui porte les sites de fixation des nucléotides, produisant ainsi l'ATP à partir de l'ADP et de l'orthophosphate inorganique (P_i). Les protons précédemment transférés par les complexes I, III et IV sont présents en plus grande quantité dans l'espace intermembranaire et tendent donc à vouloir retourner dans la matrice mitochondriale. Comme la membrane interne est imperméable aux protons, ils peuvent traverser la bicouche lipidique au niveau des rotors F_0 de l'ATP synthase. Ce flux provoque la rotation de F_0 grâce à la neutralisation par les protons des charges portées par les asparagines, ce qui entraîne des changements de conformation des sous-unités de F_1 (Nakamoto et al., 2008; Stock et al., 2000). Les sous-unités β de F_1 connaissent trois conformations qui se succèdent: (dans l'ordre) 1-lâche (L), 2-serrée (S) et 3-ouvert (O). Chacune des trois sous-unités β est dans l'une de ces trois positions, qui ont un lien direct avec la fixation (position L), la transformation (position S) et la libération (position O) des métabolites de la synthèse de l'ATP. En conformation L, le site catalytique de β a une grande affinité pour l'ADP et le P_i , ce qui provoque leur fixation. En conformation S, le site actif se resserre sur les substrats et les condense en ATP, pour lequel il a une très grande affinité: l'énergie mécanique de contraction du site actif provoque la formation d'une liaison ester phosphorique entre l'ADP et le P_i (Nakamoto et al., 2008; Stock et al., 2000). La conformation O, enfin, avec une détente relative du site actif, donc une moindre compatibilité tridimensionnelle avec la molécule d'ATP, permet la libération de celle-ci dans la matrice mitochondriale (Nakamoto et al., 2008; Stock et al., 2000). L'hydrolyse de l'ATP est très exergonique et peut être couplée à de très nombreuses réactions endergoniques au sein de la cellule. La variation d'enthalpie libre (ΔG) lors de la réaction d'hydrolyse de l'ATP en ADP vaut $-51,8$ kJ/mole. L'ATP est pour cette raison une molécule riche en énergie chimique (d'hydrolyse), mais qui ne doit pas être considérée comme une réserve énergétique car la demi-vie de l'ATP est d'environ une minute. Des mutations dans les gènes codant pour des sous-unités de ce complexe ont été reliées au développement de pathologies telles que le NARP (neuropathie, ataxie et rétinite

pigmentaire) ou le syndrome de Leigh (Tsao CY et al. 2001). L'exportation de l'ATP hors de la mitochondrie est couplée à l'importation de l'ADP. Ce processus est réalisé par les transporteurs des nucléotides adényliques (ANT). L'ANT échange une molécule d'ADP³⁻ cytosolique contre une molécule d'ATP⁴⁻ matricielle. Etant donné que ce processus est électrogénique, l'échange ADP-ATP s'accompagne d'une consommation du potentiel de membrane mitochondrial (Trézéguet V, Pélosi L, Lauquin GJ, 2008). L'ANT humain serait présent sous 4 isoformes: l'ANT1 qui est exprimée majoritairement dans les muscles et le cerveau, l'ANT2 qui est exprimée dans les tissus fortement prolifératifs (tels que les cellules embryonnaires et cancéreuses) et les cellules non différenciées, l'ANT3 qui est exprimée ubiquitairement et l'ANT4 qui est exprimée dans les cellules germinales. L'ANT2 serait faiblement exprimée dans les tissus sains, alors que son expression augmenterait dans les cellules cancéreuses. Les isoformes ANT1 et ANT3 exporteraient l'ATP vers le cytosol tandis que l'ANT2 effectuerait l'opération inverse (Chevrollier et al., 2011).

f. Les supercomplexes

La vision de l'organisation des complexes du STE a quelque peu changé depuis quelques années. En effet, le premier modèle, le modèle *solid-state* de Chance et Williams (Chance and Williams, 1955) qui stipulait que les interactions entre les complexes et la position de ces complexes dans la membrane était fixe, a changé graduellement parce que les enzymes du STE semblaient fonctionnelles même lorsqu'elles étaient isolées comme des complexes individuels (Hatefi et al., 1962). Plus tard, ce premier modèle a été substitué par le modèle *random collision* proposé par Hackenbrock et al, (Hackenbrock et al., 1986) qui démontrait que les complexes étaient disposés dans la membrane aléatoirement et que leurs interactions étaient dues au hasard. Bien que plusieurs études semblaient appuyer ce dernier modèle (Höchli and Hackenbrock, 1976), le concept d'une organisation figée des complexes ne fut jamais abandonné puisqu'on notait des associations entre certains complexes, notamment le III et le IV (Hatefi et al., 1962; Sones et al., 1987; Stock et al., 2000). De plus, des études récentes ont démontré l'existence d'associations physiques entre certains complexes du STE. En fait, en présence de détergents, tels que le triton ou la digitonine, il est possible d'isoler les complexes sous plusieurs formes. Par exemple, on trouve des supercomplexes I-III, I-III-IV et III-IV (Acín-Pérez et al., 2008; Schägger, 2001). Les complexes ou supercomplexes seraient donc organisés en respirasomes fonctionnels, selon une stoechiométrie précise: le supercomplexe I₁III₂, pouvant lui-même être assemblé en I₁III₂IV₂ et I₁III₂IV₄, les indices faisant référence à la quantité de complexes individuels

présents dans les supercomplexes (Hatefi, 1985; Schägger, 2001). Le complexe II n'a jamais été observé en association avec d'autres complexes, tout comme l'ATP synthase, qui existe néanmoins à l'état de dimère. Ce dernier, toutefois, semble interagir avec le transporteur des nucléotides adényliques (ANT) et le transporteur de phosphate, formant un ATP-synthasome (Ko et al., 2003). De tels assemblages pourraient donc permettre le « channeling » des substrats entre les complexes (Lenaz et al., 2007), ce qui contredit le modèle du *random collision*. Par exemple, la séquestration de l'ubiquinol entre les complexe I et III pourrait augmenter la vitesse de leur réaction enzymatique respective et la respiration mitochondriale globale (Bianchi et al., 2004; Genova et al., 2008; Lenaz et al., 2007). La formation de ces supercomplexes semble avoir une importance physiologique puisque ces structures pourraient augmenter la vitesse de transfert des électrons, avoir un rôle régulateur sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire, influencer la structure des crêtes de la membrane interne, augmenter la stabilité des complexes et enfin augmenter la capacité d'insertion des protéines dans la membrane interne mitochondriale (Boekema and Braun, 2007). Récemment, des analyses d'imagerie par cryo-microscopie électronique ont révélé des clichés confirmant l'existence de supercomplexes (Althoff et al., 2011)

6. Gluconéogenèse

En période de jeûne, le glucose peut être synthétisé par la voie de la néoglucogenèse ou gluconéogenèse à partir de précurseurs comme le pyruvate, le lactate, le glycérol ou la glutamine. La majeure partie du glucose est synthétisée à 90% dans le foie et à 10 % dans les reins. La néoglucogenèse est activée pour maintenir le taux de glucose sanguin. Elle permet également la régénération du NADH. La gluconéogenèse n'est pas exactement l'inverse de la glycolyse. Elle est régulée par quatre enzymes majeurs: la pyruvate carboxylase (PC), la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), la Fructose-1,6-bisphosphatase (F1,6BP) et la glucose-6-phosphatase (Glc-6-Pase) (**Figure 5**). La PEPCK est l'enzyme contrôlante majeure de la néoglucogenèse et présente deux isoformes codées par deux gènes nucléaires différents: PCK1 code pour la PEPCK cytosolique et PCK2 code pour la PEPCK mitochondriale qui produit environ 40% du PEP total dans le foie en période de jeûne (Stark and Kibbey, 2014). L'activité de la PEPCK peut être régulée par le ratio ATP/ADP, le statut redox et par le flux dans le cycle de Krebs. En effet, une étude RMN ^2H et ^{13}C menée sur des souris déficientes en PEPCK montre une incapacité à produire le glucose par la gluconéogenèse lors d'un jeûne,

une augmentation de cinq fois du ratio NADH/NAD^+ (statut redox) avec une accumulation des intermédiaires du cycle de Krebs (Burgess et al., 2004).

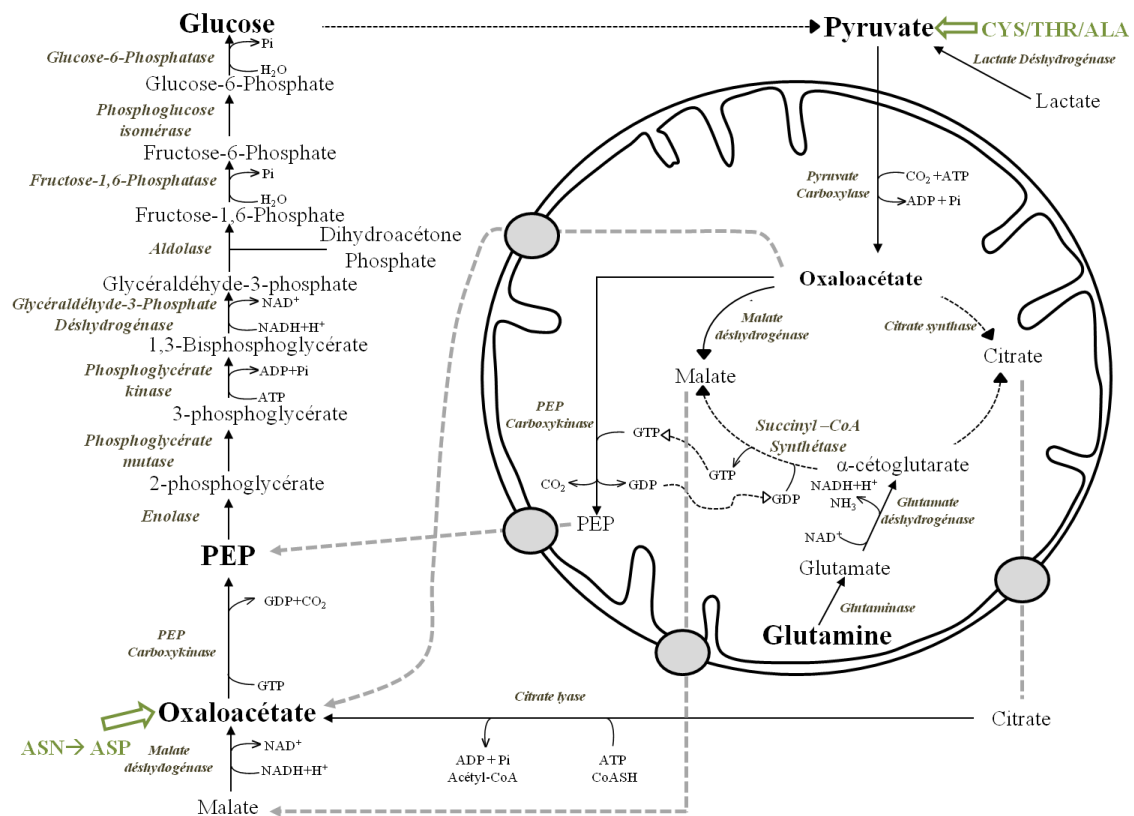


Figure 5 : La voie de la gluconéogenèse produit du glucose et régule sa concentration sanguine tout en régénérant le NADH. Cystéine (CYS), thréonine (THR), alanine (ALA), Asparagine (ASN), aspartate (ASP).

La pyruvate carboxylase (PCX) permet la formation d'oxaloacétate (OAA) à partir de pyruvate en consommant de l'ATP et du CO_2 . Lors d'un manque en ATP, l'oxaloacétate sera dirigé vers le cycle de Krebs pour alimenter les OXPHOS en NADH et FADH_2 . Sinon l'OAA rentre dans la voie de la néoglucogenèse par différents circuits. L'OAA est transformé en PEP par la PEPCK mitochondriale, le PEP est alors exporté dans le cytosol par un transporteur encore inconnu. Comme nous le verrons dans la partie résultats, nous avons identifié ce transporteur en étudiant le remodelage métabolique causé par une privation en glucose. L'oxaloacétate peut aussi être directement exporté hors de la mitochondrie, il est alors catalysé en PEP par la PEPCK cytosolique. L'OAA peut aussi être transformé dans la mitochondrie en

malate par la malate déshydrogénase. Le malate est alors exporté dans le cytosol par la navette malate/pyruvate ou malate/aspartate. Dans le cytosol ce malate peut donc être à nouveau être transformé en OAA par la malate déshydrogénase. Le PEP est alors formé par la PEPCK cytosolique à partir de l'OAA. Le glucose produit du pyruvate par la glycolyse et ce pyruvate donne du malate via le cycle de Krebs. Le malate peut être formé également à partir de la glutamine. La glutamine est dégradée par la glutaminase mitochondriale pour former le glutamate qui sera à son tour transformé en α -cétoglutarate par l'enzyme glutamate déshydrogénase. L' α -cétoglutarate rentre dans le cycle de Krebs et forme le malate. Cependant l' α -cétoglutarate peut aussi « remonter » le cycle de Krebs et former du citrate. Ce citrate est exporté hors de la mitochondrie via son transporteur SLC25A1. Le citrate est alors transformé en OAA et en acétyl-CoA par l'enzyme ATP-citrate lyase (ACLY). La PEPCK cytosolique catalyse la transformation de l'OAA en PEP (Stark and Kibbey, 2014). Ce PEP est alors catalysé en 2PG, puis 3PG jusqu'au Fr-1,6-BP. Le Fr-1,6-BP va former le Fr-6-P par la Fructose-1,6-bisphosphatase. La dernière étape de la gluconéogenèse est contrôlée par la glucose -6-phosphatase et permet la synthèse de glucose. La gluconéogenèse fait partie du cycle de Cori. Au cours d'un exercice violent, la vitesse de production du pyruvate par la glycolyse excède la vitesse d'oxydation du pyruvate par le cycle de Krebs. L'accumulation du NADH et du pyruvate va former du lactate. Le lactate passe dans le sang et va jusqu'au foie, où il sera oxydé en pyruvate qui par la gluconéogenèse va former du glucose libéré dans le sang afin d'alimenter les muscles (Cori and Cori, 1929).

7. Transporteurs mitochondriaux (famille SLC25)

L'imperméabilité de la membrane interne mitochondriale impose la présence de nombreux transporteurs membranaires capables de réaliser l'import et l'export des métabolites nécessaires au maintien de l'homéostasie énergétique et de la vie cellulaire. Ces transporteurs appartiennent à une grande famille de protéines membranaires intrinsèques appelés SLC25 (solute carrier) ou MCF (Mitochondrial Carrier Family). On dénombre aujourd'hui jusqu'à 53 transporteurs appartenant à la famille SLC25 (Palmieri, 2014). Ces transporteurs possèdent tous une signature caractéristique composée d'une structure tripartite dans la séquence primaire, autrement dit de la répétition de trois motifs P-X-[D/E]-X-X-[R/K] et de six hélices α transmembranaires (Palmieri, 2013). Les transporteurs, étant codés par le génome nucléaire, doivent être importés et donc traverser la membrane externe puis être insérés dans la membrane interne mitochondriale. Ceci se déroule en cinq étapes: prise en

charge par des chaperonnes à la sortie du ribosome, puis transport vers des machineries spécifiques d'import situées dans la mitochondrie, tout d'abord vers le complexe général d'import TOM de la membrane externe mitochondriale, qui les transfère ensuite vers l'espace inter-membranaire, où des membres du complexe d'import TIM de la membrane interne se chargent de les insérer sous une forme correctement repliée et donc fonctionnelle (Rehling et al., 2004). Ces transporteurs font le lien entre les réactions métaboliques se déroulant dans le cytosol et celles se déroulant dans la mitochondrie. Ils sont classés en quatre sous-familles en fonction des molécules qu'ils échangent: transporteur d'acides aminés (glutamate, aspartate...), transporteurs de nucléotides-dinucléotides (ATP, ADP...), transporteurs de carboxylates et de corps cétoniques (citrate, malate, α -cétoglutarate...) et enfin les transporteurs de substrats additionnels (protons, phosphate...) (Palmieri, 2014) (**Figure 6**).

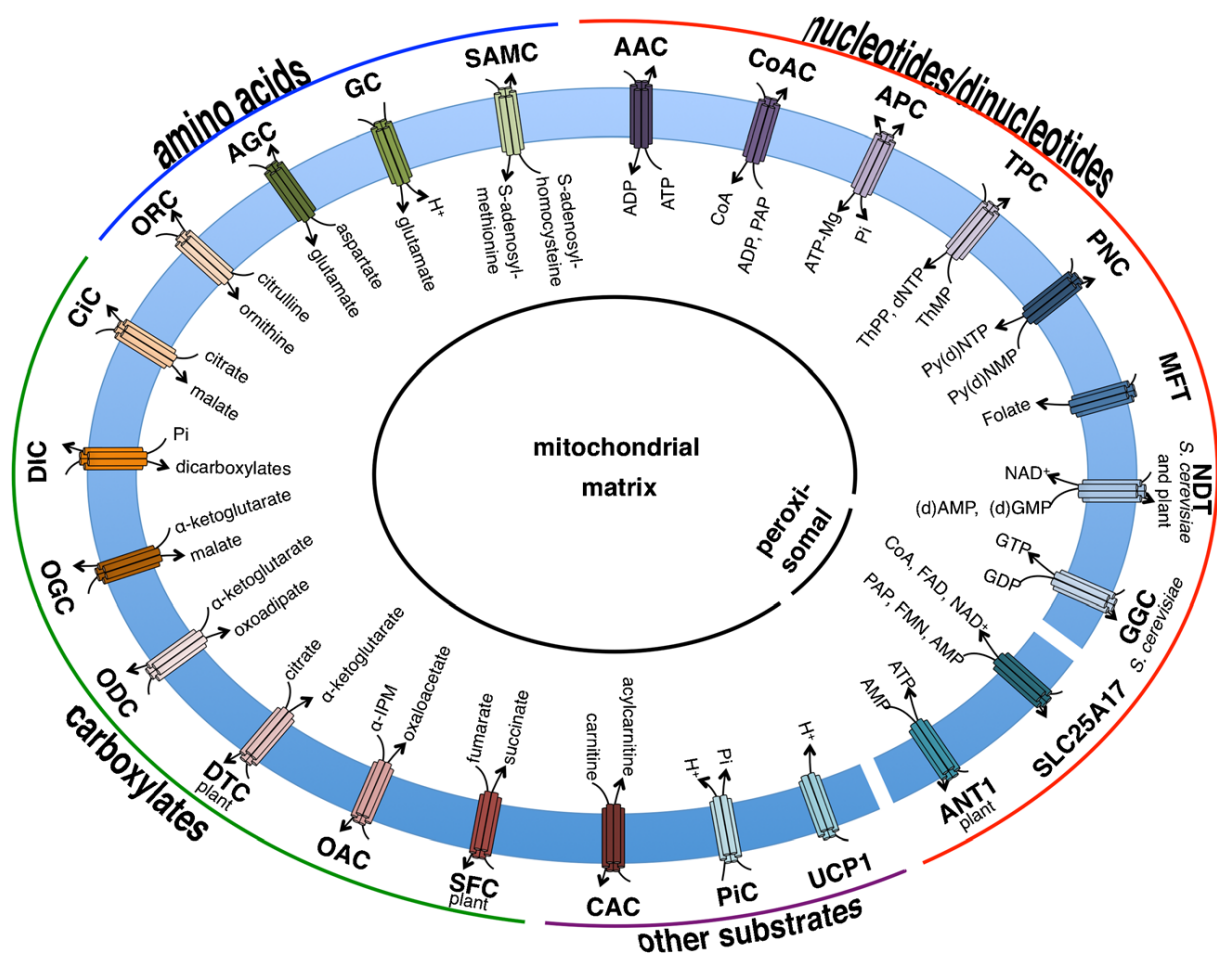


Figure 6 : Les transporteurs mitochondriaux de la famille SLC25 sont répartis en quatre groupes en fonction de ce qu'ils échangent : transporteur d'acides aminés, transporteurs de

nucléotides-dinucléotides, transporteurs de carboxylates et de corps et transporteurs de substrats additionnels (Palmieri, 2014).

Au cours de cette thèse, je vais m'intéresser plus particulièrement à un membre de cette famille: le **SCL25A12** (Aralar1 ou AGC1), l'échangeur glutamate/aspartate déjà décrit plus haut. Il joue un rôle important dans la régulation du métabolisme énergétique notamment dans la navette malate/aspartate (activée lorsque la concentration cytoplasmique de NADH est élevée) mais aussi dans le métabolisme de la glutamine (Cf. Chapitre I.9). SLC25A12 est un antiport qui importe du glutamate et un proton dans la mitochondrie et exporte de l'aspartate dans le cytosol. Ce transport est électrogénique c'est-à-dire qu'il dépend du potentiel de membrane (Palmieri et al., 2001). Il a été montré que la citrine (SLC25A13) et aralar (SLC25A12) sont des isoformes du transporteur glutamate/aspartate (AGC).

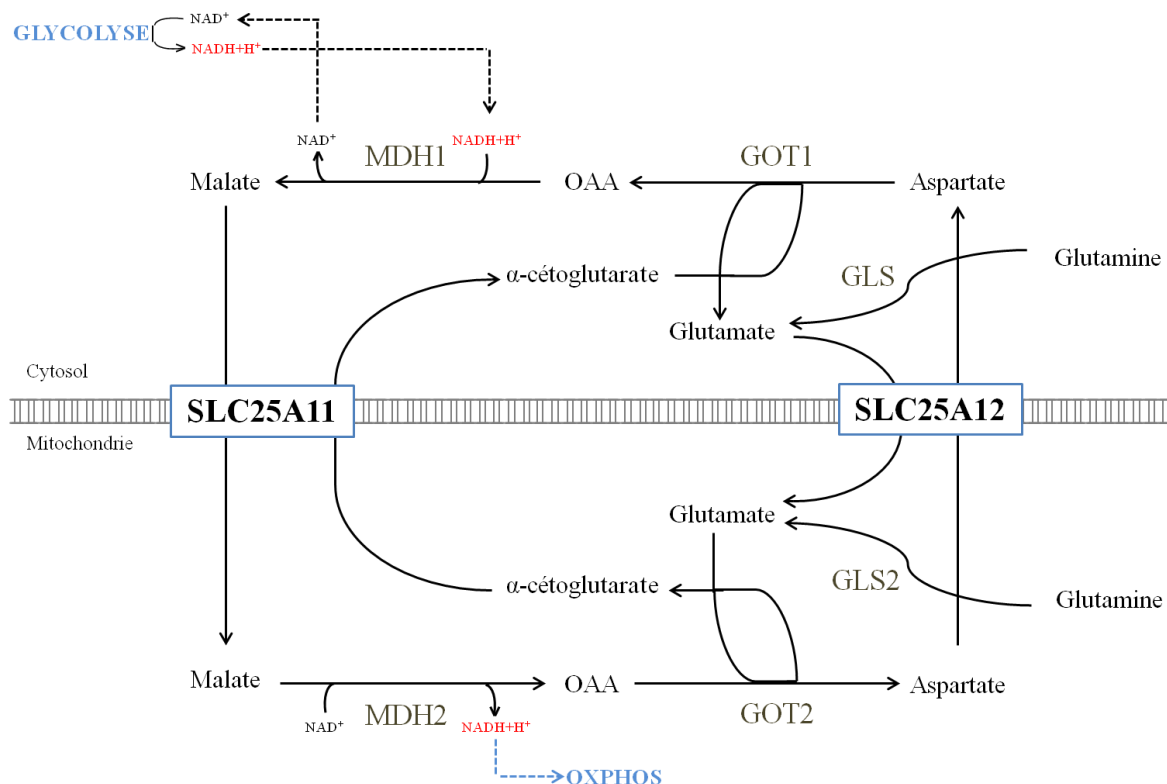


Figure 7 : Navette malate/aspartate composée de deux transporteurs SCL25A12 et SLC25A11 qui échangent le malate et l'aspartate entre la mitochondrie et le cytosol. Malate déshydrogénase (MDH), glutamate oxaloacétate transaminase (GOT), glutaminase (GLS).

La navette malate/aspartate (**Figure 7**) comporte deux protéines de transport dans la membrane interne de la mitochondrie: l'une échange réversiblement de part et d'autre de la membrane un malate contre un α -cétooglutarate (SLC25A11 ou OMC); l'autre échange de la même façon, un aspartate contre un glutamate et un proton (SLC25A12). Si le rapport des concentrations NADH/NAD^+ dans le cytoplasme et l'espace intermembranaire vient à s'élever, la malate déshydrogénase (MDH) cytoplasmique réduira de l'oxaloacétate en malate; ce malate qui diffuse dans l'espace intermembranaire va être échangé par le transporteur de la membrane interne contre un α -cétooglutarate qui sort par SLC25A11. Une fois entré dans la matrice, la MDH mitochondriale va oxyder ce malate en oxaloacétate: de cette façon, l'hydrogène du NADH qui avait servi à réduire le malate à l'extérieur, se trouve transporté à l'intérieur de la mitochondrie. La glutamate oxaloacétate transaminase 2 (GOT2) mitochondriale peut utiliser cet oxaloacétate supplémentaire qu'elle transforme en aspartate, tandis qu'elle convertit un glutamate en α -cétooglutarate pour remplacer celui qui est sorti. Il y a donc un glutamate en moins et un aspartate en trop dans la mitochondrie. Le second transporteur (SLC25A12) fera sortir l'aspartate en échange d'un glutamate et d'un proton. La glutamate oxaloacétate transaminase cytoplasmique (GOT1) transforme l'aspartate sorti en oxaloacétate qui peut recommencer le cycle (Palmieri et al., 2001). SLC25A12 est activé par le calcium (del Arco and Satrustegui, 1998). En effet, une augmentation de la concentration calcique active les déshydrogénases au sein du cycle de Krebs ce qui augmente la concentration en NADH et active SLC25A12 (Palmieri et al., 2001)(Cf. Chapitre II.1). Lorsque le gène codant ce transporteur est muté cela entraîne retard mental, de l'épilepsie, une hypotonie et une hypomyélinisation. Les échanges glutamate/aspartate sont réduits de 85%. Dans certains cas, une augmentation de la concentration en lactate est observée (Falk MJ et al. 2014). Il existe à ce jour 14 maladies qui sont liées à des mutations des gènes qui codent pour les SLC25. La dérégulation des SLC entraînent des anomalies métaboliques et peuvent engendrer des cancers.

8. β -oxydation des acides gras

Le stockage des acides gras représente une grosse réserve énergétique. La β -oxydation des acides gras permet leur dégradation ce qui libère leur potentiel énergétique. Les acides gras ne peuvent entrer dans les cellules que s'ils sont sous forme libre, c'est-à-dire non complexés en triglycérides ou à l'albumine. La lipoprotéine lipase permet d'hydrolyser les triglycérides circulant dans le sang en acides gras libres et ainsi d'avoir accès à cette source

d'énergie. Les acides gras libres pénètrent ensuite dans les cellules (Figure 8). La β -oxydation peut avoir lieu dans les peroxysomes (acides gras à chaînes longues, (Wanders, 2014)) et dans la mitochondrie. Dans ce cas, les acides gras libres à longues chaînes doivent tout d'abord être couplés avec l'acyl-CoA. Cette réaction, dépendante de l'ATP, est catalysée par les acyl-CoA synthétases. Une fois formée, dans le cytoplasme, les acyl-CoA sont transportés dans la mitochondrie pour être dégradés en acétyl-CoA par la voie de la β -oxydation afin de produire de l'ATP. La β -oxydation des acides gras requiert alors trois étapes: le transport des acyl-CoA dans la mitochondrie, la dégradation des acyl-CoA en acétyl-CoA et l'oxydation des acétyl-CoA à travers le cycle de Krebs (**Figure 8**).

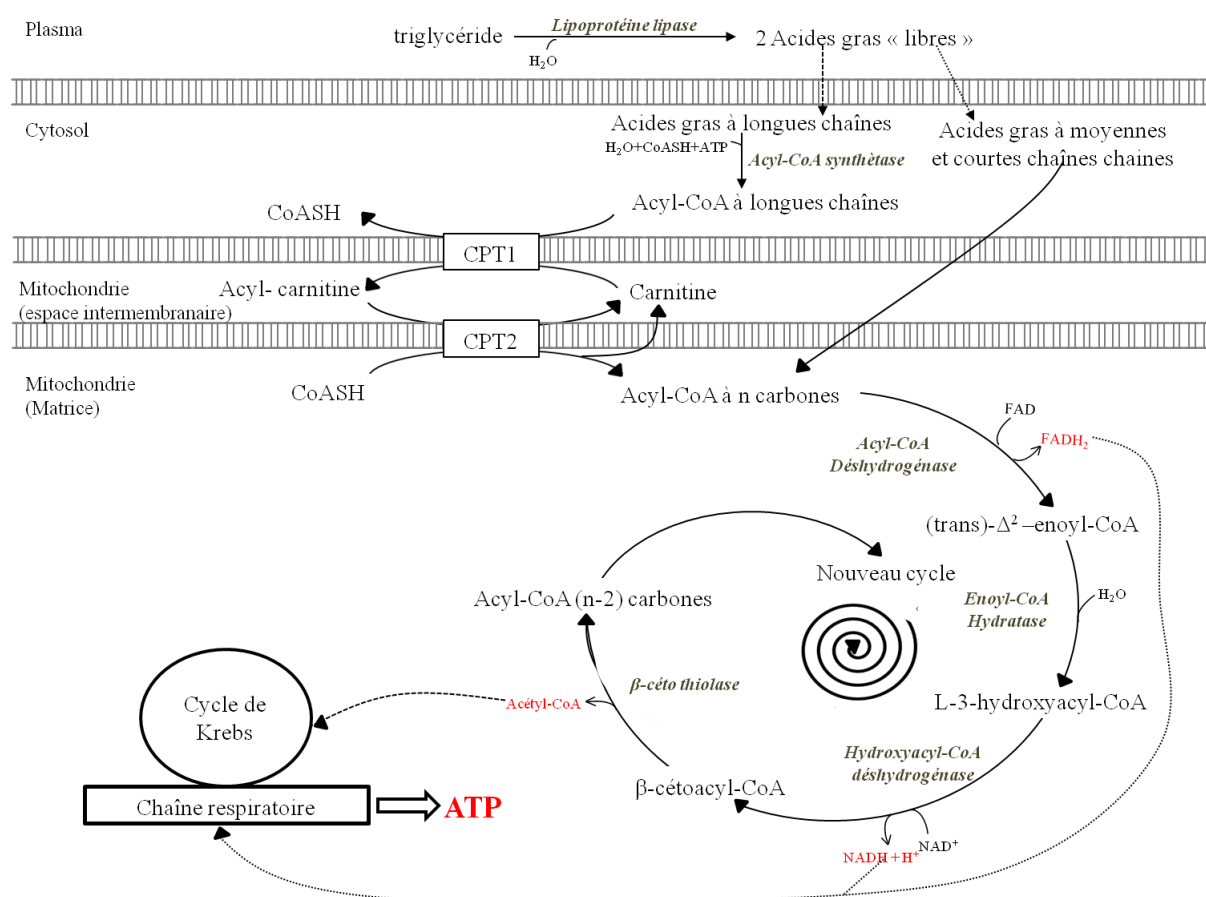


Figure 8 : La β -oxydation des acides gras permet la dégradation des acides gras apportant la $NADH$ et le $FADH_2$ nécessaires aux OXPHOS pour produire de l'ATP. Carnitine palmitoyl transférase 1 (CPT1), carnitine palmitoyl transférase 2 (CPT2)

Bien que l'activation des acides gras en acyl-CoA ait lieu dans le cytoplasme, les acyl-CoA sont oxydés dans la mitochondrie. Cependant, les acyl-CoA à longues chaînes ne traversent pas la membrane interne de la mitochondrie. Ils doivent donc être transportés. Pour

ce faire, le groupement O-acyl des acyl-CoA est transféré à un groupement carnitine. Cette réaction catalysée par la carnitine palmitoyl transférase 1 (CPT1) conduit à la production d'un acyl-carnitine. L'acyl-carnitine est ensuite transporté dans la matrice par la carnitine palmitoyl transférase 2 (CPT2) qui catalyse la liaison du groupement O-acyl de l'acyl-carnitine à une molécule de CoA afin de reformer l'acyl-CoA. La molécule de carnitine ainsi libérée est retournée dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie afin de pouvoir transporter la prochaine molécule d'acyl-CoA. Une fois entrée dans la mitochondrie, les acyl-CoA sont dégradés en acétyl-CoA par une succession cyclique de quatre réactions enzymatiques. La première réaction est catalysée par l'acétyl-CoA déshydrogénase. Le produit de la réaction est le trans- Δ^2 -enoyl-CoA. Cette réaction enzymatique nécessite la réduction du FAD en FADH₂. Dans la deuxième réaction, sous l'action de l'énoyl-CoA hydratase permet la formation du 3-L-3-hydroxyacyl-CoA. Ce dernier est par la suite transformé en β -cétoacyl-CoA par la hydroxyacyl-CoA déshydrogénase. Cette réaction mène aussi à la réduction d'une molécule de NAD⁺ en NADH. Finalement, le β -cétoacyl-CoA est scindé en deux molécules par la β -cétoacyl-CoA thiolase, ce qui conduit à la production d'une molécule d'acétyl-CoA et à la formation d'un acyl-CoA ayant une chaîne aliphatique plus courte de deux carbones que l'acyl-CoA de départ. Ainsi, pour chaque cycle d'oxydation d'un acyl-CoA, une molécule d'acétyl-CoA, une molécule de FADH₂ et une molécule de NADH sont formées. L'oxydation des acyl-CoA se poursuit jusqu'à ce que toute la chaîne aliphatique soit dégradée en acétyl-CoA. Lorsque la chaîne aliphatique comprend un nombre impair de carbones, le dernier cycle d'oxydation conduit à la formation d'une molécule d'acétyl-CoA et une molécule de propionyl-CoA. Ce dernier est transformé en succinyl-CoA afin qu'il puisse être métabolisé à travers le cycle de Krebs. La dernière étape de l'oxydation des acides gras consiste à l'oxydation des molécules d'acétyl-CoA en CO₂ par le cycle de Krebs. Comme dans le cas du métabolisme du glucose, l'acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs en se combinant à l'oxaloacétate sous l'action de l'enzyme citrate synthétase.

L'oxydation des acides gras est un processus hautement énergétique. Par exemple, l'oxydation d'une molécule de palmitate (un acide gras à 16 carbones) conduit à la production de 7 FADH₂, 7 NADH et 8 molécules d'acétyl-CoA. La phosphorylation oxydative des équivalents réducteurs mène à la production de 131 molécules d'ATP. Puisque l'activation de la molécule de palmitate par l'acyl-CoA synthétase requiert deux molécules d'ATP, la formation nette à partir d'une molécule de palmitate est donc de 129 molécules d'ATP

(Carracedo et al. 2013). La β -oxydation des acides gras est la voie qui permet la production la plus importante d'ATP.

9. Glutaminolyse(s)

La glutamine est l'acide aminé non essentiel le plus abondant dans le plasma. La glutamine joue un rôle vital dans le métabolisme car c'est la source la plus importante de nitrogène réduit essentiel à la synthèse de nucléotides et d'acides aminés non essentiels (DeBerardinis et al., 2007a). Il permet également, avec le glucose, la synthèse d'acétyl-CoA qui est le précurseur essentiel des acides gras (Metallo et al., 2012). Il existe plusieurs voies de dégradation de la glutamine (**Figure 9**) (DeBerardinis et al., 2007a; Fendt et al., 2013; Metallo et al., 2012; Mullen et al., 2012).

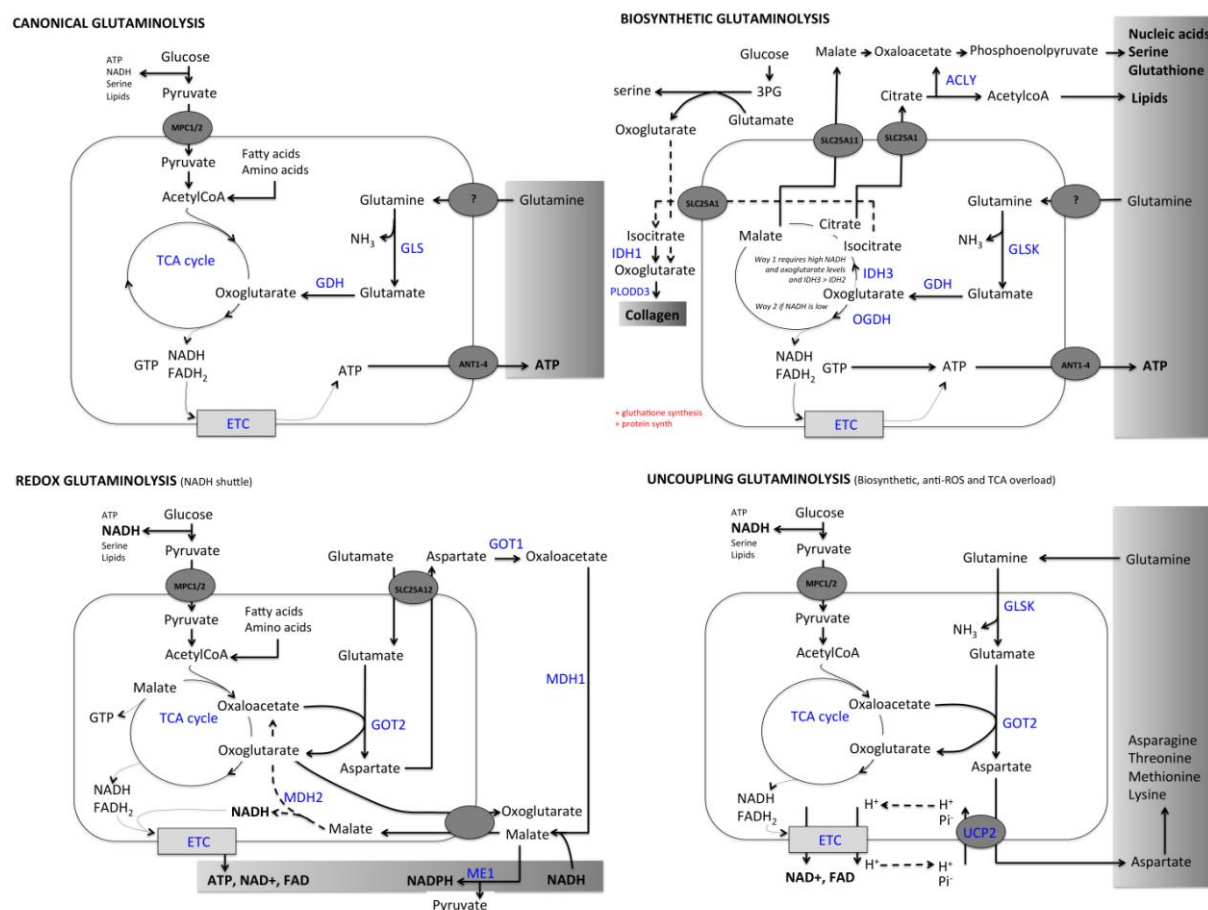


Figure 9 : Les voies de la glutaminolyse. Différentes possibilités existent pour dégrader la glutamine en fonction des besoins cellulaires. Glutaminase (GLS), glutamate déshydrogénase

(GDH), isocitrate déshydrogénase (IDH), oxoglutarate déshydrogénase (OGDH); ATP-citrate lyase (ACLY), glutamate oxaloacétate transaminase 1 (GOT1), glutamate oxaloacétate transaminase (GOT2), malate déshydrogénase 2 (MDH2).

La première est la voie de la glutaminolyse canonique: la glutamine rentre dans le mitochondrie par un transporteur comme SLC1A5 (ou ASTC2) ou SLC38A7, puis la glutaminase (GLS) et la glutamine déshydrogénase (GDH) transforment la glutamine en α -cétoglutarate qui rentre dans le cycle de Krebs. Cette voie génère de l'ATP. Il existe deux types de GDH : la GDH1 qui est NAD-dépendante et la GDH2 qui est NADP-dépendante.

La deuxième voie est la glutaminolyse biosynthétique. Comme dans la voie précédente, la glutamine est transformée par la GLS puis la GDH en α -cétoglutarate. La différence se situe au niveau du cycle de Krebs. Quand le ratio NADH/NAD⁺ est élevé, le cycle de Krebs ne fonctionne pas dans la bonne direction. Dans ce cas, l' α -cétoglutarate est converti en isocitrate par IDH3 (qui dépend du NADH mais pas du NADPH). L'isocitrate sort alors du cycle de Krebs. Le citrate et le malate sont exportés dans le cytosol pour permettre la formation de lactate, de lipides et de la néoglucogenèse (DeBerardinis et al., 2007a). Lors d'une hypoxie, cette voie est stimulée notamment pour permettre la synthèse d'acétyl-CoA (Fendt et al., 2013).

La troisième possibilité est la glutaminolyse REDOX: la glutamine est transformée dans le cytosol en glutamate par la GLS. Le glutamate est importé dans la mitochondrie par le transporteur SLC25A12 (Aralar, AGC1). Comme expliqué précédemment, SLC25A12 permet l'entrée dans la mitochondrie d'un glutamate et d'un proton en échange d'un aspartate qui sort de la mitochondrie. Ce transporteur est couplé à l'enzyme glutamate oxaloacétate transaminase 2 (GOT2) qui transforme le glutamate en α -cétoglutarate tandis qu'elle convertit l'oxaloacétate en aspartate. L' α -cétoglutarate peut être catalysé par le cycle de Krebs pour former l'ATP par les OXPHOS ou alors être exporté de la mitochondrie par le SLC25A11 qui avec le SLC25A12 forme la navette malate-aspartate. L'aspartate qui sort est converti en oxaloacétate par la GOT1. Cet oxaloacétate est converti en malate par la malate déshydrogénase. Ce malate va soit rentrer dans la mitochondrie par la navette malate-aspartate soit être transformé en pyruvate par l'enzyme malique (Lyssiotis et al., 2013; Son et al., 2013). Selon Son *et al.*, l'objectif de cette glutaminolyse REDOX qui se termine par l'enzyme

malique est de produire du NADPH utilisé pour régénérer les défenses antioxydantes. Nous verrons dans les résultats (partie 1) que HRAS dirige plutôt la glutamine vers la production de sérine.

La quatrième voie est la glutaminolyse découplante (hypothèse non démontrée): l'aspartate produit par le glutamate (via GOT2) est exporté dans le cytosol par UCP2, en échange avec un phosphate inorganique et un proton (Vozza et al., 2014). Ceci réduit le gradient électrochimique des protons généré par la chaîne respiratoire.

Une dernière voie permet la liaison entre le métabolisme de la glutamine et celui de la sérine: la GLS2 permet la conversion de la glutamine en glutamate (Cf. Chapitre I.12). La phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH) convertit le 3-PG en 3-phosphohydroxypyruvate lui même transformé en 3-phosphosérine par la phosphosérine aminotransférase 1 (PSAT1). Lors de cette dernière réaction la PSAT1 convertit par la même occasion du glutamate en α -cétoglutarate. Cette voie permet d'une part la production d'ATP grâce à l' α -cétoglutarate qui rejoint le cycle de Krebs et d'autre part la synthèse de sérine que j'aborde plus en détail dans le Chapitre I.12 (Locasale, 2013). Lorsque la mitochondrie est déficiente (anomalie de la chaîne respiratoire, mutation de la fumarate hydratase), la glutamine devient la première source pour permettre la formation de citrate et d'acétyl-CoA.

10. Dégradation des autres acides aminés

Les acides aminés en excès ne peuvent pas être stockés. Ils subissent une première dégradation qui enlève le groupement α -aminé soit par transamination, soit par oxydation. L'ion ammonium est récupéré et recyclé pour former un autre acide aminé ou éliminé. Le squelette carboné obtenu après le départ du groupement aminé peut aussi être récupéré pour synthétiser l'acide aminé correspondant ou servir de précurseur à la synthèse des glucides (cas des acides aminés glucoformateurs) ou converti en acétyl-CoA pour la synthèse des acides gras (cas des acides aminés cétoogènes). Les acides aminés glucoformateurs (glucogéniques) sont l'alanine, l'asparagine, l'aspartate, le glutamate, la glutamine, la proline, la sérine, la cystéine (acides aminés non essentiels) et l'arginine, l'histidine, la méthionine, la thréonine et la valine (acides aminés essentiels) dont la dégradation du squelette carboné libèrent l'un des intermédiaires suivants : α -cétoglutarate, oxaloacétate, fumarate, succinyl-CoA et pyruvate. Les acides aminés cétoogènes (ou cétoniques) sont la leucine et la lysine (acides aminés essentiels) dont la dégradation du squelette carboné fournit l'acétyl-CoA ou l'acétoacétyl-

CoA. Les acides aminés à la fois glucoformateurs et cétoènes sont la tyrosine (non essentiel), la phénylalanine, le tryptophane et l'isoleucine (essentiels) (Ishikura et al., 2011) (**Figure 10**).

a. Acides aminés glucoformateurs

L'oxaloacétate est le squelette carboné de l'asparagine et l'aspartate. L'asparagine est hydrolysée par l'asparaginase en aspartate et en ammoniac. L'aspartate subit la transamination et libère de l'oxaloacétate et de l'ammoniac. L'oxaloacétate peut être récupéré pour former l'acide aminé correspondant ou entrer dans le cycle de Krebs ou bien dans la voie de la gluconéogenèse pour former du glucose, de la sérine, ou du ribose-5-phosphate.

La dégradation de la glutamine, de la proline, de l'arginine, de l'histidine et du glutamate conduit à l' α -cétooglutarate :

- ❖ La glutamine est hydrolysée en glutamate par la glutaminase. Le glutamate est oxydé en α -cétooglutarate par transamination ou oxydation en présence de l'enzyme glutamate déshydrogénase.
- ❖ La proline est oxydée en pyrroline 5-carboxylate puis une seconde fois en glutamate qui est transaminé en α -cétooglutarate.
- ❖ L'arginine est hydrolysée par l'arginase en ornithine et en urée.
- ❖ L'histidine subit une séquence de réactions qui conduit à la formation du N-ormininoglutamate. Le transfert d'un groupement sur le tétrahydrofolate libère le glutamate, oxydé ensuite en α -cétooglutarate.

La dégradation de l'alanine, la cystéine, la sérine et de la thréonine conduit au pyruvate :

- ❖ L'alanine est transaminée pour former du pyruvate.
- ❖ La cystéine subit une désulfuration et donne du pyruvate.
- ❖ La sérine par déshydratation et transamination peut être convertie en pyruvate.

Le succinyl-CoA est formé suite à la dégradation des squelettes carbonés de la méthionine, de l'isoleucine, de la valine, et de la thréonine :

- ❖ La méthionine est un acide aminé essentiel qui peut servir de précurseur à la synthèse de la S-Adénosylméthionine (SAM) (cf. Chapitre I.12). Il peut aussi servir de précurseur à la synthèse de la cystéine en se condensant à la sérine pour donner la

cystéine et l' α -cétobutyrate. Le propionyl-CoA issu de l'oxydation de l' α -cétobutyrate peut donner le succinyl-CoA.

- ❖ La thréonine, après transamination est, déshydratée en α -cétobutyrate. Ce dernier est oxydé en propionyl-CoA qui est carboxylé pour produire du succinyl-CoA.
- ❖ La valine et l'isoleucine après transamination et déshydrogénation il y a formation du propionyl-CoA qui est ensuite carboxylé en succinyl-CoA. L'isoleucine fournit en même temps de l'acétyl-CoA. Elle est donc glucoformatrice et cétogénique.

b. Acides aminés cétogènes

Les squelettes carbonés de la leucine, de la lysine et du tryptophane donnent des produits terminaux comme l'acétyl-CoA ou l'acétoacétyl-CoA.

- ❖ La leucine, après transamination, donne un squelette carboné qui subit la même séquence de réactions que ceux de la valine et de l'isoleucine. Le produit final est l'acétyl-CoA au lieu du succinyl-CoA.
- ❖ La lysine subit une séquence de réactions, qui fournit entre autre l'acétoacyl-CoA comme produit final. Ce dernier peut être clivé en acétyl-CoA.
- ❖ Le tryptophane fait aussi l'objet d'une longue séquence de réactions qui conduit à la formation de l'acétoacétyl-CoA.

c. Acides aminés glucoformateurs et cétogènes

Ce dernier groupe d'acides aminés est constitué de la phénylalanine, de la tyrosine et de l'isoleucine. Ils libèrent après transamination un squelette dont le catabolisme complexe produit, d'une part, du succinyl-CoA ou du fumarate (précurseurs de néoglucogenèse) et, d'autre part, de l'acétoacétyl-Co ou de l'acétyl-CoA (précurseurs cétogéniques).

- ❖ La phénylalanine est hydroxylée en tyrosine
- ❖ La tyrosine forme du fumarate et de l'acétoacétate. Le fumarate est repris par le cycle de Krebs pour former du malate. L'acétoacétate est converti en acétyl-CoA.

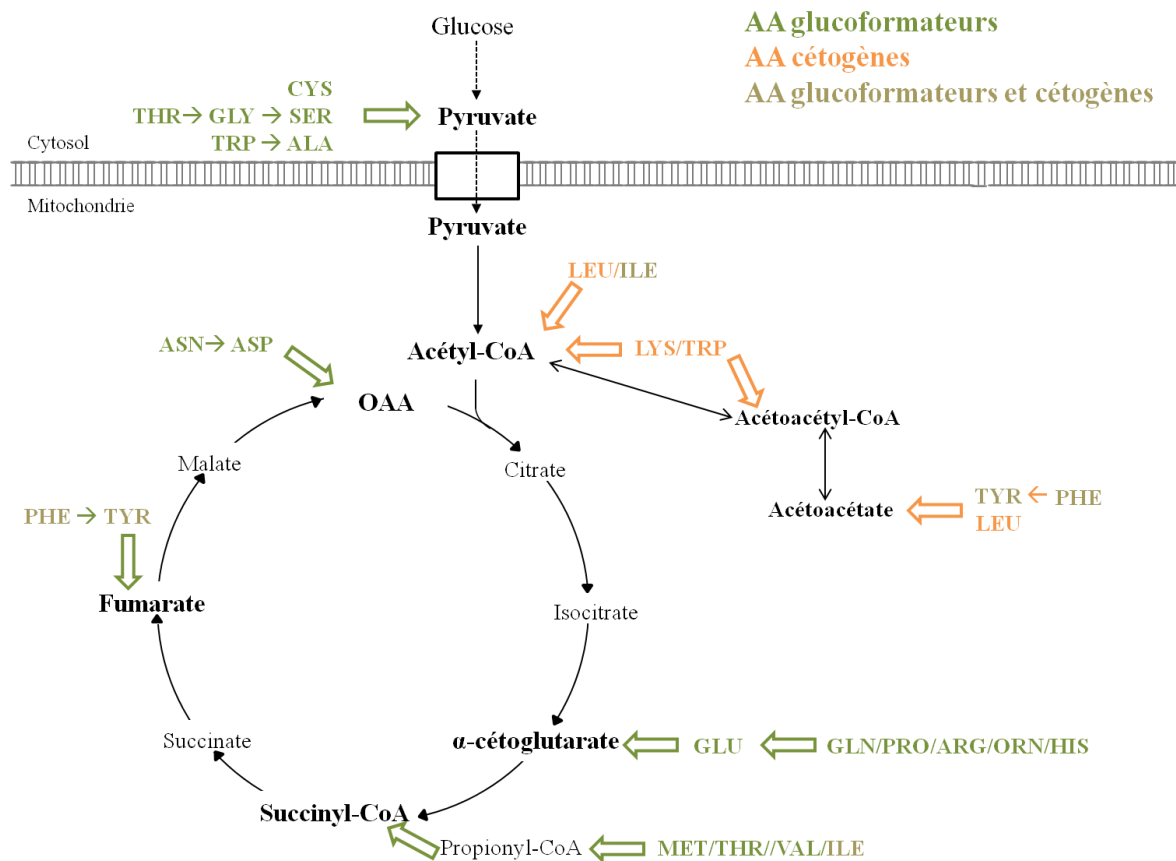


Figure10 : Dégradation des acides aminés. Les acides aminés glucoformateurs sont l'alanine (ALA), l'asparagine (ASN), l'aspartate (ASP), le glutamate (GLU), la glutamine (GLN), la proline (PRO), la sérine (SER), la cystéine (CYS), l'arginine (ARG), l'histidine (HYS), la méthionine (MET), la thréonine (THR) et la valine (VAL) dont la dégradation du squelette carboné libèrent forme : α -cétoglutarate, oxaloacétate (OAA), fumarate, succinyl-CoA ou le pyruvate. Les acides aminés cétoènes sont la leucine (LEU) et la lysine (LYS) dont la dégradation du squelette carboné fournit l'acétyl-CoA ou l'acétoacétyl-CoA. Les acides aminés glucoformateurs et cétoènes sont la tyrosine (TYR), la phénylalanine (PHE), le tryptophane (TRP) et l'isoleucine (ILE).

11. Synthèse des acides gras

La biosynthèse des acides gras met en jeu des voies métaboliques spécifiques qui ne sont pas seulement l'inverse de la β -oxydation. Elle s'effectue au niveau cytosolique dans les cellules, principalement du foie et du tissu adipeux. Lors de leur biosynthèse, les acides gras en formation sont liés à une protéine de transport d'acyl (ACP) et non à un groupement CoA

comme lors de leur dégradation (Turner et al., 2014). L'acétyl-CoA est le substrat essentiel de la biosynthèse des acides gras. Il est formé à partir du pyruvate ou du catabolisme des acides aminés ou par la dégradation du citrate qui provient du cycle de Krebs. Ce citrate peut être produit par la dégradation du glucose ou de la glutamine. Il est alors exporté hors de la mitochondrie via son transporteur (SLC25A1), et transformé en oxaloacétate et acétyl-CoA par l'ATP citrate lyase (ACLY). La production d'acétyl-CoA est activée par le citrate et réprimée par le palmitoyl-CoA. L'acétyl-CoA carboxylase catalyse la première réaction de synthèse d'acide gras à partir d'acétyl-CoA et d'une molécule d'ATP pour former un malonyl-CoA. Toutes les activités enzymatiques nécessaires à la biosynthèse des acides gras sont regroupées au sein d'une même chaîne peptidique qui constitue donc une protéine multi-enzymatique géante : l'acide gras synthase (FAS). Ceci permet un meilleur rendement par la proximité des sites catalytiques (**Figure 11**).

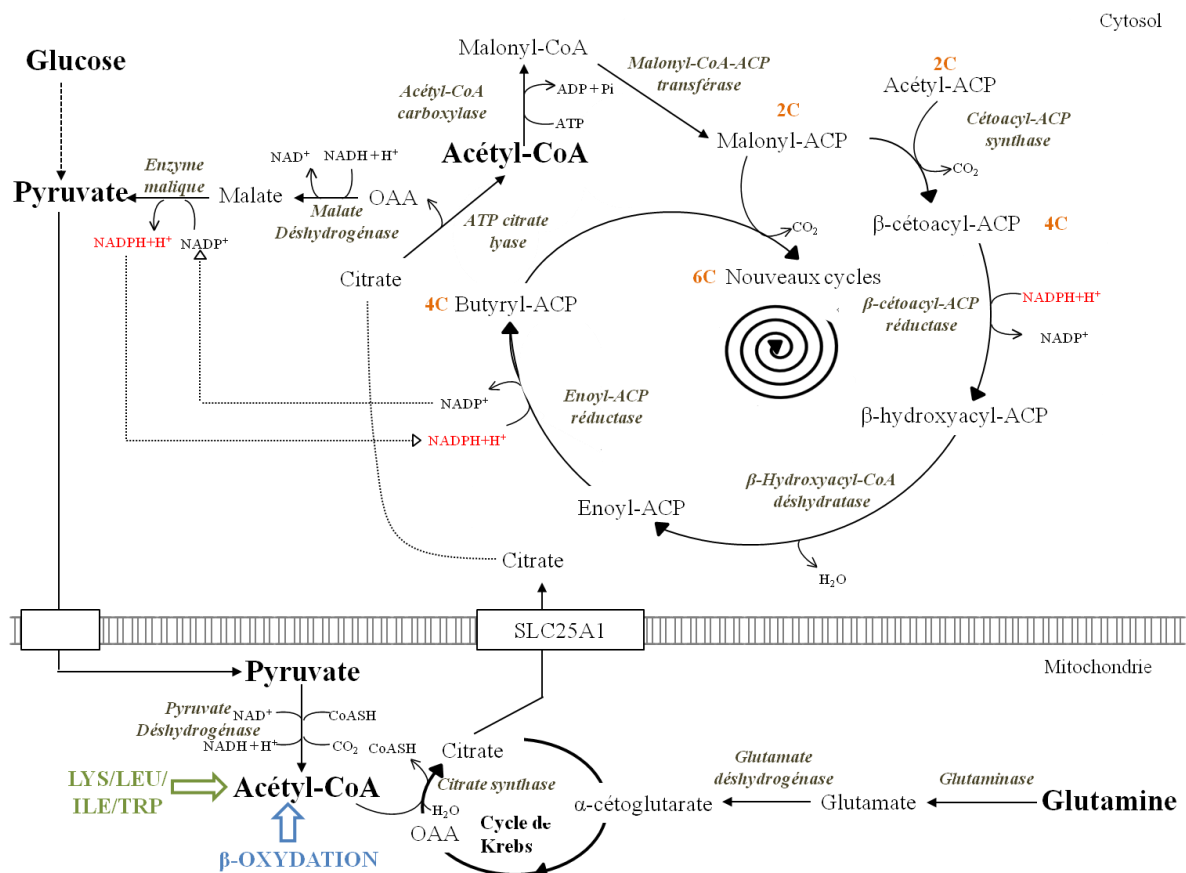


Figure 11 : Voie de biosynthèse des acides gras. La succession d'un cycle de réactions impliquant l'acétyl-CoA et le NADPH permet la synthèse de lipides de différentes tailles constituant ainsi une réserve énergétique.

La biosynthèse des acides gras se poursuit par le transfert du malonyl-CoA et de l'acétyl-CoA vers l'ACP. Les deux molécules (malonyl-ACP et acétyl-ACP) vont être condensées par la cétoacyl-ACP synthase pour former la β -cétoacyl-ACP. Ce métabolite, réduit en présence de NADPH par la β -cétoacyl-ACP réductase produit la β -hydroxyacyl-ACP qui va elle-même subir une déshydratation par la β -hydroxyacyl-ACP déshydratase et former l'énoyl-ACP. La dernière réaction est une réduction par la 2,3-trans-énoyl-ACP réductase et le NADPH qui aboutit à la formation du butyryl-ACP. Il y a ensuite un processus d'élongation de la chaîne acyl gras utilisant les mêmes étapes citées précédemment. Chaque cycle ajoutant deux carbones, l'élongation s'arrête en général après 7 ou 8 cycles. Le résidu acyl de 16 ou 18 carbones est libéré du complexe FAS. Si le malonyl CoA est en grande quantité, les chaînes d'acides gras seront plus longues. Pour synthétiser une molécule de palmitate, il faut 7 acetyl-CoA, 7 malonyl-CoA et 14 NADPH (Ecker and Liebisch, 2014).

12. Métabolisme de la sérine

La sérine joue un rôle central dans l'anabolisme, en lien direct avec la conversion du glucose. En effet, la sérine peut être synthétisée à partir d'un intermédiaire de la glycolyse : le 3-phosphoglycérate (3-PG) (**Figure 12**). Environ 10% de ce 3-PG est dévié pour la synthèse de sérine (Possemato et al., 2011a).

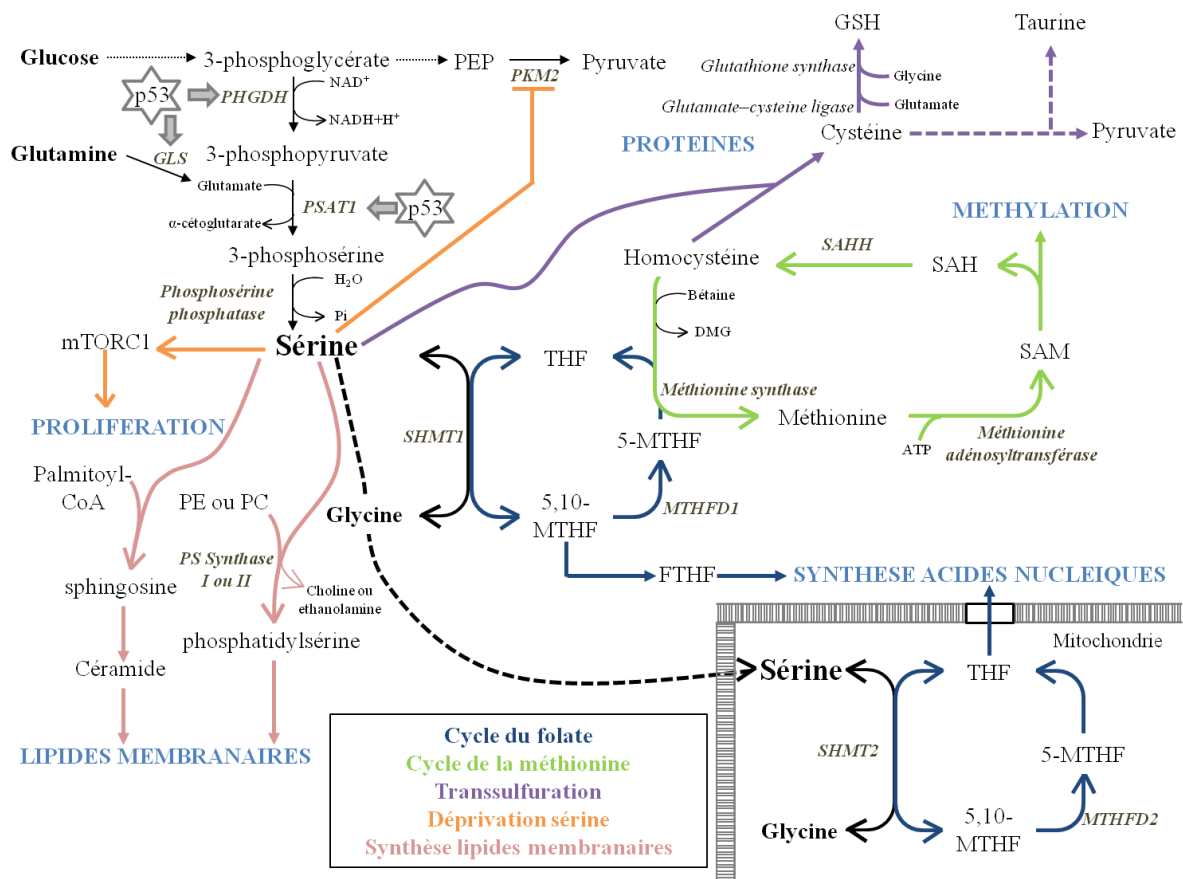


Figure 12 : Métabolisme de la sérine faisant intervenir le cycle du folate, le cycle de la méthionine et la transsulfuration de la cystéine permettant la formation de glutathion et de taurine. La sérine permet la synthèse de lipides et de protéines et d'acides nucléiques (par l'intermédiaire du tétrahydrofolate). phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH), phosphosérine aminotransférase 1 (PSAT1), S-adenosylméthionine (SAM), S-adenosylhomocystéine (SAH), S-adenosylhomocystéine hydrolase (SAHH), sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT), tétrahydrofolate (THF)

La phosphoglycérate déshydrogénase (PHGDH) convertit le 3-PG en 3-phosphohydroxypyruvate lui même transformé en 3-phosphosérine par la phosphosérine aminotransférase 1 (PSAT1). L'enzyme PSAT1 convertit par la même occasion du glutamate en α -cétoglutarate, reliant la biosynthèse de sérine au cycle de Krebs. La phosphosérine phosphatase (PSPH) permet la formation finale de sérine à partir de 3-phosphosérine (Figure 12). La voie de biosynthèse de sérine est une cible thérapeutique potentielle car la PHGDH est surexprimée notamment lors de cancers comme le cancer du sein, des mélanomes et des tumeurs astrocytaires (Liu et al., 2013; Possemato et al., 2011a). La PSAT1 peut aussi être dérégulée, surexprimée dans le cancer du poumon non à petites cellules, le cancer du colon et

le cancer du sein (Vié et al., 2008; Yang et al., 2014b) et déficiente dans le cas de maladies neurodégénératives (Hart et al., 2007). La sérine fait également partie du métabolisme monocarboné (ou métabolisme C1) qui désigne l'ensemble des réactions dans la cellule qui nécessite le transfert d'unités monocarbonées (unités C1). La synthèse de protéines, de lipides ou d'acides nucléiques requiert l'intervention de ce métabolisme monocarboné. La sérine est la source principale d'unités C1 chez la plupart des organismes (Cossins and Chen, 1997). Deux cofacteurs jouent un rôle essentiel dans le métabolisme C1 : les folates et la S-adénosylméthionine (SAM). La sérine est donc liée au cycle du folate et au cycle de la méthionine (voir ci-après). Le folate issu de l'alimentation permet de fournir les unités monocarbonées nécessaires à un grand nombre de réactions métaboliques comme la synthèse de sérine par exemple. Le folate a pour structure de base l'acide folique. Au niveau cellulaire, seul le tétrahydrofolate (THF) peut véhiculer des unités C1 comme le radical méthyl. SAM, quant à lui, est le donneur universel de groupement méthyl notamment utilisé pour la méthylation des histones, de l'ADN ou des protéines. La méthionine, un acide aminé essentiel, est nécessaire non seulement pour la synthèse des protéines mais également pour la synthèse de SAM (Mato et al., 2008). SAM est synthétisée dans le cytosol à partir de la méthionine et de l'ATP par la méthionine adénosyltransférase (MAT) (Mato et al., 2002). Cette étape de biosynthèse constitue la première réaction du cycle de la méthionine. L'utilisation de SAM dans les réactions de méthylation cellulaire (méthylation histones, ADN ou protéines) génère de la S-adénosylhomocystéine (SAH) qui est hydrolysée en homocystéine (Hcy) et en adénosine par la S-adénosylhomocystéine hydrolase (SAHH). Cette série de réactions porte le nom de transméthylations. L'Hcy formée se situe au carrefour de deux voies métaboliques : la trans-sulfuration et la reméthylation. Dans la voie de la trans-sulfuration, l'homocystéine est transformée de façon irréversible en cystéine pour la production, entre autres, du glutathion et de la taurine (Mato et al., 2008). Dans le foie, environ 50 % de la cystéine utilisée dans la synthèse du glutathion provient de la trans-sulfuration. La voie de la reméthylation recycle l'Hcy en méthionine. Chez les mammifères, notamment dans le foie et les reins, il existe une voie de reméthylation catalysée par la bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT) utilisant la bétaine comme donneur du groupement méthyl. La voie la plus connue de reméthylation de l'Hcy est catalysée par la méthionine synthase qui utilise le 5-MTHF comme donneur du groupement méthyl. La voie de méthylation constitue la dernière étape du cycle de la méthionine. Cette dernière étape est couplée au cycle du folate. Le 5-MTHF donne son groupe méthyl à l'Hcy et forme le THF. La sérine hydroxyméthyltransférase 1 (SHMT1) permet la conversion réversible de la sérine en glycine et du THF en 5,10-MTHF dans le

cytosol. Le 5,10-MTHF est alors converti soit en 5-MTHF par la MTHFD1 et le cycle folate est fini, soit en FTHF qui permet, entre autre, la synthèse d'acides nucléiques. La conversion réversible de la sérine en glycine s'effectue également dans la mitochondrie en présence de THF et aboutit à la synthèse du 5,10-MTHF. L'enzyme clé de cette réaction est la sérine hydroxyméthyltransférase 2 (SHMT2) (Matthews RG et al. 1982). Kalhan et al., ont montré que sur 150 $\mu\text{mol/kg/h}$ de sérine synthétisée, 80 $\mu\text{mol/kg/h}$ provient du glucose et du pyruvate, 40 $\mu\text{mol/kg/h}$ de la dégradation de protéines et 30 $\mu\text{mol/kg/h}$ de la glycine (Kalhan and Hanson, 2012). Maintenir la quantité ou le flux de sérine dans la cellule est crucial pour le maintien de la méthylation et des fonctions cellulaires (prolifération...). Le métabolisme de la sérine met donc en jeu des voies de signalisation impliquant p53, PKM2 ou le complexe mTORC1. p53, est un suppresseur de tumeurs (cf. Chapitre II.3) qui stimule la PHGDH et PSAT1. Une étude menée sur des souris privées de sérine et de glycine montre une diminution plus importante de la taille des tumeurs de xénogreffes p53^{-/-} par rapport à des tumeurs de xénogreffes p53^{+/+} (Maddocks et al., 2013). PKM2 comme indiqué précédemment (Cf. Chapitre I.2) est une isoforme de la pyruvate kinase qui est surexprimée dans certains cancers. Une privation en sérine entraîne une diminution de l'activité de PKM2 ce qui entraîne une accumulation des intermédiaires de la glycolyse et notamment du 3-PG qui est alors dévié pour synthétiser de la sérine nécessaire à la prolifération cellulaire (Chaneton et al., 2012). Cette étude a montré que la PKM2 possédait une "serine binding pocket" et pouvait donc être directement régulée par la sérine. S'il y a une phosphorylation de la tyrosine 105 cela active PKM2, tandis qu'elle est inhibée par une oxydation de la cystéine 358 (Chaneton et al., 2012). Le complexe mTORC1, quant à lui, est le régulateur principal de la cellule lors d'une privation en acides aminés. Lors d'une privation en sérine et dans des cellules surexprimant PKM2, Ye et al. ont montré que mTORC1 reste activé pour permettre la prolifération cellulaire (Ye et al., 2012).

La sérine est aussi impliquée dans la biosynthèse de lipides membranaires qui composent les membranes de la cellule mais aussi ses organites comme la mitochondrie. Ces lipides interviennent dans le trafic vésiculaire mais aussi dans la transduction de signaux extracellulaires. La phosphatidylsérine (PS) est un lipide membranaire. La PS peut être synthétisée à partir de phosphatidylcholine (PC) et de sérine par la PS synthase I ou à partir de phosphatidylethanolamine (PE) et de sérine par la PS synthase II. La PS est le phospholipide le plus abondant dans le cortex cérébral humain (Kim et al., 2014a). Ces deux enzymes se situent dans le réticulum endoplasmique (RE) et plus particulièrement dans les régions où le

RE échange des lipides avec la mitochondrie, les Mitochondria Associated Membranes (MAMs) (Vance and Vance, 1990). La PS est située dans la membrane plasmique du côté cytosolique et interagit avec Akt ou PKC, deux protéines connues pour leur rôle dans la prolifération et la survie cellulaire mais aussi la régulation du métabolisme énergétique (Kim et al., 2014a). Enfin, en se liant au palmitoyl-CoA la sérine peut synthétiser la sphingosine puis la céramide, qui appartiennent à un autre groupe de lipides membranaires : les sphingolipides qui composent notamment la gaine de myéline (Lamari et al., 2013).

La sérine permet donc la synthèse de méthionine et de cystéine qui sont les deux acides aminés constitutifs du glutathion fortement impliquée dans la détoxification (Cf. Chapitre I.3) (Hepatocytes et al., 1997; Toroser and Sohal, 2007). La cystéine peut également donner du pyruvate et de la taurine. La taurine est un acide aminé jouant un rôle de neurotransmetteur, c'est aussi un précurseur des sels biliaires qui intervient dans la digestion des lipides. C'est un régulateur de l'homéostasie cellulaire en gérant le pool d'osmolytes. La taurine joue aussi un rôle anti-oxydant et anti-apoptotique (Lambert et al., 2014). La concentration de taurine varie de 5 à 50 mM et sa concentration est importante dans les tissus à haute activité métabolique comme le muscle squelettique qui contient 70 % de la concentration de taurine de tout le corps (Huxtable, 1992). La taurine peut être synthétisée dans le cytosol mais également dans la mitochondrie (Ubuka et al., 2008). Justement, la taurine régule la mitochondrie. En effet sur des souris KO pour le transporteur de la taurine, il y a une diminution du contrôle respiratoire des mitochondries du foie (Warskulat et al., 2006). Une privation de sérine entraîne une diminution de la respiration mitochondriale et de l'activité des complexes I et III (Huxtable, 1992). Dans des cellules de précurseurs neurales de la zone sous-ventriculaire du cerveau de la souris, un ajout de taurine augmente le potentiel mitochondrial et la prolifération cellulaire (Ramos-Mandujano et al., 2014).

II. Régulation biochimique des voies métaboliques

1. Mécanismes moléculaires de régulation bioénergétique

Les bases de la régulation du métabolisme énergétique reposent sur les travaux de Warburg, Lenhinger, Krebs, Chance, Peterson, Weinhouse, et Vaupel entre autres (Scheffler, 1999; Weinhouse, 1956). Le niveau énergétique de la cellule peut être contrôlé à différents

niveaux: génétique, moléculaire ou micro-environnemental. Ces régulations passent par différentes voies de signalisations dont les mécanismes sont regroupés dans la notion de "multi-step control" du métabolisme énergétique (Benard et al., 2010). Chez les mammifères, environ 90% de l'oxygène est consommé par la mitochondrie pour produire l'ATP, mais cela dépend des tissus et des substrats disponibles. Cette production est contrôlée par des intermédiaires métaboliques tels que l'ATP lui-même, le citrate, le F1,6bP, le Pi et le calcium entre autres.

Un autre niveau de régulation se situe au niveau des flux métaboliques comme la synthèse d'ATP ou la respiration identifiée par Chance et Williams dans les années 50 (contrôle respiratoire par l'ADP) (Chance and Williams 1955; Chance and Williams 1956). Ces auteurs ont montré que sur des mitochondries isolées, la concentration en ADP et Pi sont des activateurs directs des OXPHOS. Toutefois, des études sur tissus intacts montrent que les flux d'ADP et de Pi ne sont pas suffisants pour réguler à eux-seuls les OXPHOS. Des études sur le muscle cardiaque ont mis en évidence une stabilité métabolique lors de l'effort: il y a une augmentation de la consommation d'oxygène sans changement des concentrations cytosoliques d'ADP, d'ATP et de Pi (Heineman and Balaban, 1990; Korzeniewski, 2007; Sharma et al., 2005). Des résultats similaires ont été trouvés dans le cerveau (Du et al., 2008; Lei et al., 2003). Ce phénomène est dû au fait que le contrôle respiratoire par l'ADP ne prend pas en compte la variation de la concentration en substrats énergétiques.

Le calcium (Ca^{2+}) est également un facteur de régulation important car il régule des navettes comme la navette glutamate-aspartate. Comme cela a été décrit plus haut (Cf. Chapitre I.7), cette navette appartient à la famille des SLC qui permet le transport de métabolites et de cofacteurs à travers les membranes de la mitochondrie. Une partie de la régulation des OXPHOS est due à ces navettes comme la navette glutamate-aspartate (SLC25A12 aussi appelé Aralar ou AGC1) qui a servi de base au modèle nommé "Gas pedal" par Frank Gellerich (Gellerich et al., 2013). Le modèle montre deux voies de régulation en fonction de la concentration en calcium dans des mitochondries de cerveau. Si $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cytosolique}} > 400\text{nM}$, le calcium cytosolique rentre dans la mitochondrie par l'uniport calcique (CaUP). Le calcium va alors stimuler l'isocitrate déshydrogénase, l' α -cétoglutarate déshydrogénase et la pyruvate déshydrogénase qui vont produire du NADH utilisé par les OXPHOS. Si $[\text{Ca}^{2+}] < 400\text{nM}$, la formation de pyruvate est stimulée par SLC25A12 qui régénère le NADH formé par la glycolyse ou la lactate déshydrogénase qui produisent le pyruvate et qui peut aussi produire le pyruvate à partir de l'aspartate (cf. Chapitre I.9). En

revanche, si la concentration en calcium diminue trop ($<50-100$ nM), le glutamate ne peut plus rentrer dans la mitochondrie via SLC25A12 (Gellerich et al., 2012, 2013). Par exemple, dans les neurones SCN (suprachiasmatic nucleus), le phénomène de "Gas pedal" peut expliquer les changements de concentration calcique durant le cycle jour/nuit. Durant la nuit, la concentration calcique est entre 50-100nM ce qui est insuffisant pour stimuler SLC25A12, il y a une faible accumulation de Ca^{2+} et l'ATP est peu formé. Durant le jour, la concentration de Ca^{2+} augmente (200 -500 nM) ce qui stimule SLC25A12, l'entrée de pyruvate et une augmentation des OXPHOS et la production d'ATP.

Il existe également de nombreuses régulations moléculaires des OXPHOS comme la récente découverte d'OPA1 qui stabilise les supercomplexes respiratoires (Cogliati et al., 2013), la synthèse de l'ATP synthase qui dépend de l'assemblage du complexe III (Ostojic et al., 2013) ou bien de la régulation du niveau énergétique par la protéine RHEB qui contrôle le turnover mitochondrial (Melser et al., 2013).

Plus récemment, de nombreuses études ont porté sur le lien entre le métabolisme énergétique et la croissance cellulaire. Une des voies de signalisation centrale régulant le métabolisme énergétique de la cellule est la voie de l'AMPK (AMP-activated protein kinase) détaillée plus bas (Cf. Chapitre II.3). L'AMPK est le senseur de l'énergie cellulaire, lorsque le ratio ADP/ATP est élevé (donc en cas de besoin en ATP important), l'AMPK stimule l'expression de nombreuses protéines du système OXPHOS (Hardie et al., 2003) permettant ainsi la synthèse d'ATP (Fukuda et al., 2007). Une autre voie importante de la régulation énergétique fait intervenir PGC1 α . C'est un co-activateur transcriptionnel qui stimule les OXPHOS, la β -oxydation des acides gras en coopération avec ERR- α et la gluconeogenèse en se liant à HNF4A α (Lustig et al., 2011). Le métabolisme énergétique peut également être régulé par des facteurs environnementaux comme la concentration en oxygène. En effet, le taux d'oxygène régule les isoformes du complexe IV (COX4-1 et COX4-2)(Cf. chapitre I.5). Lorsqu'il y a une diminution de la concentration en O_2 , le facteur d'hypoxie HIF1 α (Cf. Chapitre II.3) permet un shift vers l'isoforme COX4-2 au détriment de la COX4-1 qui est dégradée par la protéine LON (protéase mitochondriale) qui est elle-même stimulée par HIF1 α (Fukuda et al., 2007). Le métabolisme énergétique est également régulé en fonction des substrats disponibles dans l'environnement cellulaire. Certaines cellules vont utiliser préférentiellement le glucose, les acides gras ou la glutamine en fonction de leur équipement enzymatique (Cf. Chapitre III.1), et dans certains cas les cellules vont devenir

"dépendantes" à un substrat comme la glutamine pour le cancer du pancréas, par exemple (Cf. Chapitre IV.8).

2. Mécanismes génétiques : Acétylation, méthylation, épissage et isoformes.

Un nouveau champ d'étude a fait son apparition dans le domaine de la bioénergétique: l'épigénétique. Elle est définie comme l'étude des modifications de l'expression des gènes qui sont transmissibles lors de la mitose et/ou la méiose, mais ne découlent pas de modifications dans la séquence de l'ADN (Wolffe, 1999). Contrairement aux modifications génétiques, les modifications épigénétiques sont dynamiques et réversibles. Les changements épigénétiques sont régulés à différents niveaux comme par exemple la modification des histones. Cela se produit dans la région N-terminale des histones accessibles à l'extérieur du nucléosome. Les modifications post-traductionnelles des histones sont dues à des (Lu and Thompson, 2012) :

- Acétylations/Déacétylations sur des lysines par des histones acétyltransférases (HAT) ou des histones déacétylases (HDAC).
- Méthylations sur des lysines ou des arginines par des histones méthyltransférases (HMT).
- Phosphorylations/Déphosphorylations sur des sérines ou des thréonines par des kinases ou des phosphatases.

Un autre niveau de régulation se trouve au niveau de l'ADN qui peut subir des (Lu and Thompson, 2012) :

- Acétylations/Déacétylations.
- Méthylations par des DNA méthyltransférases (DNMT).
- Phosphorylations/Déphosphorylations.

Si l'acétylation est clairement associée à l'activation transcriptionnelle et la déacétylation à la répression, le rôle de la méthylation semble en revanche plus complexe (Berger, 2002; Strahl and Allis, 2000). La méthylation intervient aussi dans la réparation de l'ADN et joue un rôle dans la capacité de l'organisme à réparer les cellules endommagées avant qu'elles ne deviennent cancéreuses. Les liens entre l'épigénétique et la bioénergétique sont résumés ci-dessous :

a. Acétylation/Désacétylation

Ces phénomènes sont étroitement liés au métabolisme énergétique. L'acétyl-coA est un donneur d'acetyl. Il est produit par l'ATP-citrate lyase (ACLY) mais aussi la PDH ou la β -oxydation des acides gras. Wellen et al. montrent que dans des cellules KO pour l'ACLY, il y a une réduction de l'acétylation des histones et des gènes régulant le métabolisme du glucose (Wellen et al., 2009).

b. Méthylation/Déméthylation

Un autre niveau de régulation des changements épigénétiques est la méthylation de l'ADN chez les mammifères, qui ne s'effectue que sur des résidus cytosines. Ce type de modification se produit au niveau de zones particulières, les îlots CpG, présents dans les promoteurs de nombreux gènes. Les îlots CpG sont fréquemment mutés, 25% des mutations ponctuelles dans les pathologies génétiques sont localisées au niveau des îlots CpG (Yoder et al., 1997). Pendant longtemps, la communauté scientifique pensait que la méthylation s'effectuait uniquement sur les îlots CpG, mais cela fut infirmé. De nombreuses études ont montré des méthylation de cytosines, suivie d'adénine ou de thymine (Patil et al., 2014). Cependant les méthylations CpG ont un rôle différent des méthylation non-CpG. La méthylation des îlots non-CpG est importante dans le cerveau. Après une étude au bisulfite sur génome entier, le tissu cérébral a montré l'existence de 666/2466 îlots non-CpG méthylés sur 24 individus (Varley et al., 2013). La lignée cellulaire embryonnaire HUES48 montre un taux de méthylation de CpG, CpA, CpT, et CpC égal à 67.85%, 6.68%, 1.48%, et 0.63% de tous les îlots CpG, CpA, CpT, et CpC testés, respectivement (Ziller et al., 2011). Chez les mammifères, et plus particulièrement chez l'Homme, la méthylation des cytosines est indispensable au développement et à la survie des embryons par son implication dans des processus de régulation majeure tels que la régulation des gènes, l'inactivation du chromosome X et les empreintes génétiques (Morgan et al., 2005). Cette méthylation au niveau de l'ADN est réalisée par des ADN méthyltransférase (DNMT). 3 DNMT codées par des gènes différents existent chez les mammifères. DNMT1 maintient les profils de méthylation au cours de la division cellulaire (Leonhardt et al., 1992), DNMT2 a une fonction inconnue et DNMT3 est impliquée dans la méthylation *de novo* permettant la régulation de l'expression des gènes (Okano et al., 1999). La méthylation de l'ADN est sensible à l'environnement. Un exemple frappant concerne les jumeaux monozygotes, par définition

génétiqnement identiques, qui peuvent dans certains cas développer des maladies génétiques différentes. Chez l'Homme, l'étude des modifications épigénétiques a permis de montrer que des jumeaux monozygotes adultes présentent des différences significatives au niveau des profils de méthylation des cytosines et d'acétylation des histones. Au contraire, les jumeaux plus jeunes présentent relativement peu de différence de ces profils. Cela peut s'expliquer par le fait que les jumeaux jeunes vivent souvent dans le même environnement, tandis que les sujets adultes vivent plus éloignés l'un de l'autre (Fraga et al., 2005).

Non seulement l'environnement extracellulaire, mais aussi le métabolisme énergétique (qui lui-même dépend de l'environnement...) peuvent moduler l'épigénétique. En effet, toutes les réactions de méthylations exigent de la S-adenosylmethionine (SAM) qui est le donneur universel de méthyl et qui est synthétisé à partir de méthionine et d'ATP. Lors d'un stress énergétique, la concentration d'ATP diminue ce qui entraîne une baisse de la méthylation par SAM. Un intermédiaire du cycle de Krebs, l' α -cetoglutarate est aussi le substrat de la famille d'enzymes 2-oxoglutarate-dépendent dioxygénases (2-OGDO). Cette famille regroupe les enzymes majeures de la déméthylation de l'ADN (Ten-Eleven Translocation (TETs) et des histones (Jumonji C domain containing (JmJc) déméthylases), ainsi que des prolyl hydroxylases impliquées dans la régulation de l'oxygène. Le succinate et le fumarate, qui sont deux autres intermédiaires du cycle de Krebs, peuvent inhiber les 2-OGDO. L'activité du cycle de Krebs influence donc directement le taux de méthylation de l'ADN et des histones contrôlant ainsi l'expression des gènes (Salminen et al., 2014). Les 2-OGDO ont également besoin d'oxygène pour être synthétisées, et par conséquent elles régulent le facteur HIF1 α qui est le senseur d'oxygène dans la cellule (cf. Chapitre II.3). De plus le succinate peut inhiber les prolyl-hydroxylases ce qui entraîne une augmentation du taux de HIF1 α et permet entre autre la survie des cellules cancéreuses (Raimundo et al., 2011).

Globalement, l'hypométhylation est fréquemment retrouvée dans les cancers. En parallèle, l'hyperméthylation des îlots CpG de certains gènes suppresseurs de tumeurs (p53, p21) entraînent leur inhibition ce qui aboutit à une dérégulation du cycle cellulaire permettant une prolifération illimitée. Des altérations relatives à la méthylation de l'ADN sont présentes dans plus de 65 % des cancers. La méthylation des protéines (par d'autres méthyltransférases) est essentielle à la communication entre les cellules par l'activation des récepteurs membranaires tandis que la méthylation des phospholipides permet de maintenir la flexibilité et la perméabilité des membranes cellulaires, indispensables aux échanges cellulaires. La

méthylation joue un rôle dans la détoxification cellulaire puisqu'elle permet la synthèse de glutathion.

c. Epissage et isoformes

L'épissage est un autre phénomène de régulation génique. Il correspond à l'élimination des introns et à la liaison des exons bout-à-bout dans l'ARNm mature, le choix de l'inclusion des exons peut être alternatif. Grâce à l'inclusion alternative des exons, un seul pré-ARNm peut ainsi produire plusieurs ARNm matures codant pour différentes isoformes protéiques structurellement et fonctionnellement distinctives. Des données indiquent que 70% à 88% des événements d'épissage alternatif changeraient la nature de la protéine, et seulement 19% conduiraient à la production de protéines tronquées (Modrek and Lee, 2002). L'épissage alternatif entraîne la formation d'isoformes protéiques. Les protéines isoformes sont issues soit d'un même gène suivi d'un épissage alternatif, soit de gènes différents. Les isoformes protéiques ont des séquences peptidiques proches et différencient par l'ajout ou la perte d'une partie de leurs séquences en acides aminés. Les isoformes peuvent se situer dans différents tissus comme la pyruvate kinase où PKL est exprimé dans le foie et les reins, PKR dans les érythrocytes, PKM1 est la forme majoritaire et ubiquitaire tandis que la forme PKM2 est embryonnaire. Les isoformes peuvent aussi avoir une localisation cellulaire différente comme l'isocitrate déshydrogénase (IDH). IDH1 se situe dans le cytoplasme et utilise le NADP^+ comme cofacteur. IDH2 est quant à elle localisée dans la mitochondrie tout comme l'IDH3, où elles participent au cycle de Krebs. La différence entre les deux isoformes provient du cofacteur: NADP^+ pour IDH2 et NAD^+ pour IDH3 (Metallo et al., 2012).

3. Voies de signalisation impliquées dans la régulation du métabolisme énergétique :

La régulation du métabolisme fait appel à de nombreuses voies de signalisation comme celle de l'AMPK, de la PI3K/Akt, de RAS, des sirtuines, des Foxo et HNF, de HIF1 α , p53... Il n'est pas possible ici de toutes les énumérer, et j'ai choisi de présenter les voies qui seront mentionnées par la suite dans la partie « résultats ».

a. AMPK

L'AMP-activated protein kinase (AMPK) est le principal senseur de l'état énergétique dans la cellule. En effet, le ratio ADP/ATP peut diminuer (manque d'ATP) en condition d'hypoxie, d'ischémie ou de privation en glucose. Le rôle de l'AMPK a été principalement étudié dans le foie, les muscles squelettiques, le cœur, le pancréas, les tissus adipeux et le système nerveux central. L'AMPK inhibe les voies de l'anabolisme qui consomment de l'ATP (synthèse de lipides...) et active les voies cataboliques qui produisent de l'ATP (β -oxydation des acides gras, augmentation de l'entrée de glucose dans la cellule...) (Hardie et al., 2003). L'AMPK est composée de deux sous-unités régulatrices, β et γ , et d'une sous-unité catalytique α . Chacune des trois sous-unités est codée par plusieurs gènes chez les mammifères et certains subissent des épissages alternatifs donnant ainsi une diversité importante d'hétérotrimères ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, et $\gamma 3$) (Stapleton et al., 1996). L'AMPK est activée par la phosphorylation de la thréonine 172 située dans la boucle d'activation de la sous-unité α . La sous-unité γ possède une répétition de quatre motifs CBS (cystathionine- β -synthase) formant des sites de liaison aux adénines. Le site 2 apparaît inoccupé, le site 4 se lie en permanence à l'AMP et les sites 1 et 3 se lient à l'AMP, à l'ADP ou à l'ATP qui sont en compétition. Par exemple, lorsque le ratio ATP/ADP est élevé, l'ATP va se lier préférentiellement aux sites 1 et 3. En se liant à l'AMP ou à l'ADP, la sous-unité γ permet la phosphorylation de la thr172 et empêche également sa déphosphorylation (Hardie and Alessi, 2013).

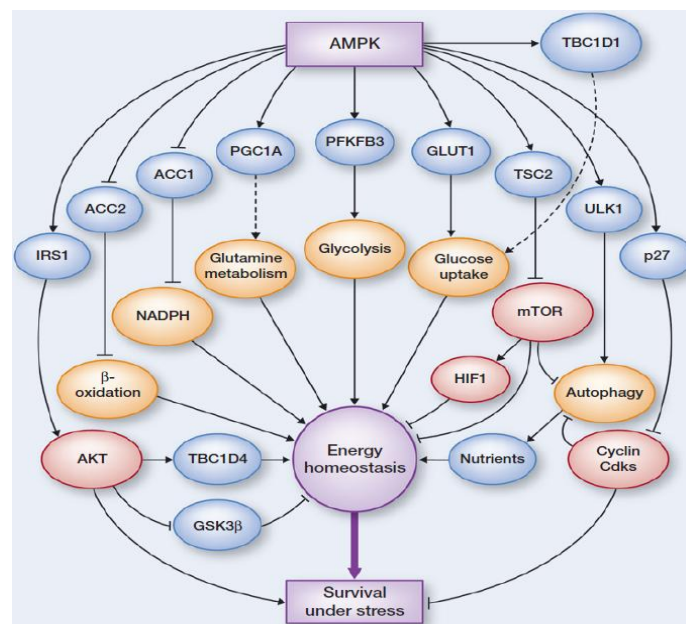


Figure 13 : Cibles de l'AMPK. (Liang and Mills, 2013). L'AMPK active de nombreuses voies pour permettre le maintien de l'homéostasie énergétique nécessaire à la survie cellulaire.

Trois kinases peuvent activer l'AMPK. L'équipe de Hardie a montré l'existence d'un complexe composé de deux autres sous-unités accessoire STRAD et MO25 et d'une enzyme active LKB1 qui phosphoryle l'AMPK sur cette thréonine 172 (Hawley et al., 2003). En 1995, ils ont également découvert qu'une autre kinase la CaMKK β (calmodulin-dependent kinase kinases) peut aussi phosphoryler l'AMPK. La CaMKK β est régulée par la concentration en AMP mais aussi par la concentration calcique (Hawley et al., 1995). TAK 1 (TGF β -activated kinase 1) active aussi l'AMPK (Xie et al., 2006). L'AMPK est centrale dans la régulation du métabolisme énergétique en permettant un "switch" de l'anabolisme vers le catabolisme. L'AMPK est une protéine kinase qui inactive les voies anaboliques comme les deux enzymes clés de la voie de synthèse des lipides et du cholestérol: l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et la 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA réductase. Cet effet inhibiteur à long terme s'effectue via l'inhibition de l'expression et de l'activité de deux facteurs de transcription lipogénique: ChREBP et SREBP (Zhou et al., 2001). L'arrêt de la synthèse de protéines passe par l'intermédiaire de mTORC1 via l'inhibition de la protéine kinase S6K1 qui induit normalement la synthèse protéique ainsi que la croissance cellulaire (Holz et al., 2005). Il a été montré que l'AMPK réprimait la synthèse protéique par l'inhibition de la voie mTOR/S6K1 via la phosphorylation de TSC2 en amont de mTOR et par la phosphorylation du complexe 1 (raptor) de mTOR (mTORC1) (van Veelen et al., 2011). Le catabolisme, quant à lui, est stimulé par l'AMPK à travers PGC1 α ou la sirtuine 1 qui stimule la biogenèse mitochondriale et le métabolisme oxydatif (Hardie and Alessi, 2013). L'autophagie est également activée par l'intermédiaire de la protéine ULK1 (**Figure 13**).

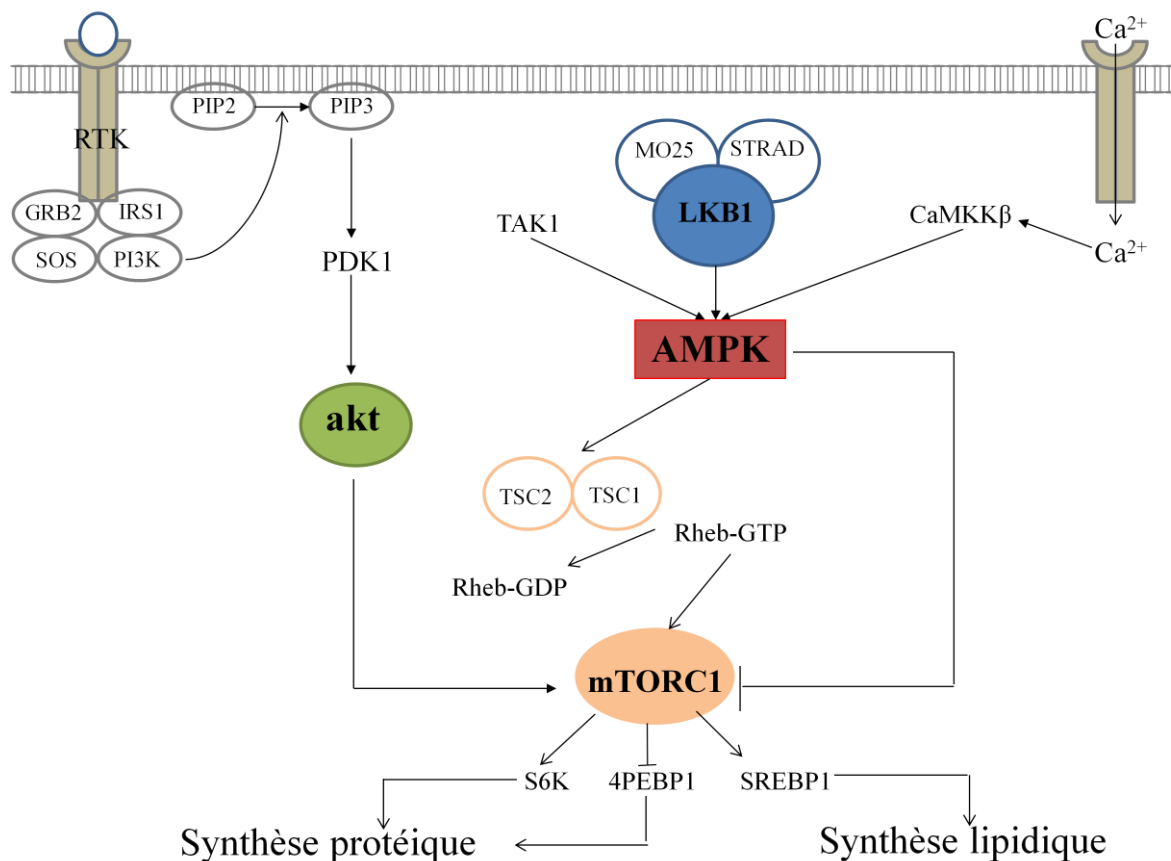


Figure 14 : La voie LKB1-AMPK-mTOR. L'AMPK peut être stimulée par le complexe LKB ou la TAK ou la CaMKKβ. L'AMPK inhibe soit directement le complexe mTORC1 soit via la phosphorylation de TSC2 (qui active Rheb-GTP) en amont de mTORC1. Il y a ainsi inhibition de la synthèse protéique et lipidique.

L'AMPK favorise la capture du glucose en augmentant l'expression et la translocation de GLUT4 à la membrane, probablement par un mécanisme commun à l'insuline: la phosphorylation du substrat de l'AKT, l'AS160. L'AMPK contribue donc à améliorer la sensibilité à l'insuline (Treebak et al., 2006). Lors d'un stress métabolique comme la privation en glucose, l'axe LKB1-AMPK-mTOR est majoritairement sollicité. Dans ce cas LKB1 phosphoryle l'AMPK qui inhibe ensuite la voie mTOR. La protéine mTOR doit être associée à RAPTOR pour être active, ce qui forme le complexe mTORC1 (sensible à la rapamycine). mTOR joue différents rôles selon les protéines qu'elle active ou inhibe. Elle régule la traduction et la synthèse protéique, le cycle cellulaire, et l'apoptose. mTORC1 active eIF4E-binding protein, libérant ainsi le facteur de transcription eIF4E, et la kinase S6K1 (ou

p70S6K), impliquée dans la biogenèse ribosomale (**Figure 14**). mTOR intervient ainsi, dans la traduction de la cycline D1 qui permet la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S, dans la traduction de HIF1/2 (hypoxia inducible factor), un facteur de transcription impliqué dans la promotion de l'angiogenèse, et dans l'expression de transporteurs situés à la surface de la membrane plasmique, comme GLUT-1. Il existe des activateurs pharmacologique de l'AMPK comme la metformine et la phenformine (Hawley et al., 2010) mais aussi l'AICAR (5-aminoimidazole- 4-carboxamide-1- β -ribofuranoside), qui entraîne une augmentation intracellulaire de ZMP, un analogue non métabolisable de l'AMP et active par conséquent l'AMPK. Les intermédiaires de la voie de l'AMPK se trouvent dérégulés dans certaines pathologies comme le diabète de type 2, le syndrome métabolique mais aussi le cancer (Cf. Chapitre IV).

b. PI3K/AKT

La voie PI3K/AKT est une voie de signalisation très importante qui permet la survie cellulaire et l'angiogenèse. La plupart des constituants de cette voie sont des oncogènes ou des suppresseurs de tumeurs ce qui explique la dérégulation fréquente de cette voie dans les cancers. La voie Pi3k/Akt est stimulée par un récepteur membranaire de type tyrosine-kinase ou par la protéine RAS qui active la PI3-kinase (PI3K). La PI3K participe à la formation d'un composé lipidique membranaire, le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PI3,4,5 P3). Ce composé recrute la sérine/thréonine kinase AKT à proximité de la membrane plasmique, où elle est alors phosphorylée (et activée) par la PDK1 (phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1). AKT est un oncogène, qui a de nombreuses cibles en aval dont mTOR (Figure 13). La protéine mTOR est elle-même régulée par la sérine thréonine kinase AKT par au moins deux mécanismes différents: par phosphorylation directe ou de manière indirecte par phosphorylation et inactivation de TSC2 (Tuberous sclerosis complex-2) (Slomovitz and Coleman, 2012). AKT, tout comme mTOR, intervient dans la régulation du métabolisme énergétique. AKT stimule la glycolyse et la synthèse d'acides gras tandis que mTOR active la synthèse protéique. TSC2 est aussi inhibé par la voie ERK ce qui permet l'activation de mTOR (Shaw and Cantley, 2006). Enfin, AKT inhibe la glycogène synthase kinase 3 β qui entraîne une répression du facteur de transcription eIF-2B ce qui aboutit à la synthèse protéique.

c. RAS

La protéine RAS est une petite GTPase appartenant à la superfamille des petites protéines G monomériques à activité guanosine triphosphate hydrolase. Il existe trois principales isoformes de Ras qui partagent 85% d'identité dans leur séquence en acides aminés: Harvey-Ras (H-Ras), Kirsten-Ras (K-Ras) et Neuroblastoma-Ras (N-Ras). KRAS subit un épissage alternatif du C-terminal et peut donner KRAS4A et KRAS4B. Ces 4 isoformes sont exprimées de manière ubiquitaire (Schubbert et al., 2007). La protéine RAS est impliquée dans les activités mitotiques de la cellule. Elle contrôle également les OXPHOS dans les tissus cancéreux ou non-cancéreux (Gough et al., 2009; Palorini et al., 2013; Telang et al., 2007a; Wei et al., 2012). La voie RAS/MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) est une des plus importantes voies d'activation de la cellule. Elle est, en général, activée par le biais d'un récepteur membranaire, lui-même stimulé par un facteur de croissance ou une cytokine. Ces récepteurs membranaires ont la particularité de posséder une activité enzymatique de phosphorylation de résidus tyrosine, appelée « activité tyrosine-kinase » permettant l'activation du récepteur par autophosphorylation, et ainsi l'activation d'une cascade de phosphorylation de nombreuses protéines. Parmi les récepteurs de facteurs de croissance capables d'activer la voie RAS/MAPK, les principaux sont l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) et les autres membres de la famille HER, le FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor), l'IGFR (Insulin-like Growth Factor Receptor) et le PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor). Les protéines Ras fonctionnent comme des "switchs" moléculaires régulés par leur liaison à la guanosine diphosphate (GDP) ou à la guanosine triphosphate (GTP) (Mitin et al., 2005). Ainsi, elles alternent entre une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP, cette dernière permettant la transduction du signal en interagissant avec des protéines situées en aval dans la voie de signalisation. Les petites GTPases présentent une haute affinité de liaison pour le GDP et le GTP, mais possèdent de faibles activités intrinsèques pour l'échange GDP/GTP et l'hydrolyse du GTP. Le cycle GDP/GTP est donc contrôlé par 2 types de protéines régulatrices: les facteurs d'échange de nucléotides à guanine (Guanosine nucleotide exchange factors, GEFs), qui facilitent le remplacement du GDP par le GTP et stimulent la formation de la forme active de Ras liée au GTP. A l'inverse, les protéines activatrices de GTPases (GTPase activating proteins, GAPs) stimulent l'activité GTPasique de la protéine G et par là-même, favorisent la forme inactive de la protéine. Les 2 états de liaison aux nucléotides (Ras-GDP ou Ras-GTP) entraînent des changements conformationnels. C'est principalement à travers ces

changements conformationnels de Ras que les protéines régulatrices et les effecteurs «reconnaissent» le statut nucléotidique de la GTPase (Mitin et al., 2005) (**Figure 15**).

L'activation de la voie des MAPK, également appelée « ERK » (Extracellular signal-Regulated Kinase), débute par l'activation et le recrutement à la membrane par RAS de la protéine RAF-1. Cette première protéine kinase est responsable de l'activation par phosphorylation de la MAPK-kinase ou MEK (MAPK-ERK-Kinase). À son tour, MEK active de manière hautement spécifique, par double phosphorylation, ERK, ce qui entraîne sa translocation au niveau du noyau et l'expression de gènes précoces codant pour des facteurs de transcription (c-FOS) et autres (c-MYC, c-JUN ou JUNB) qui, à leur tour, stimulent l'expression d'un grand nombre de gènes impliqué notamment dans la prolifération (Roberts and Der, 2007).

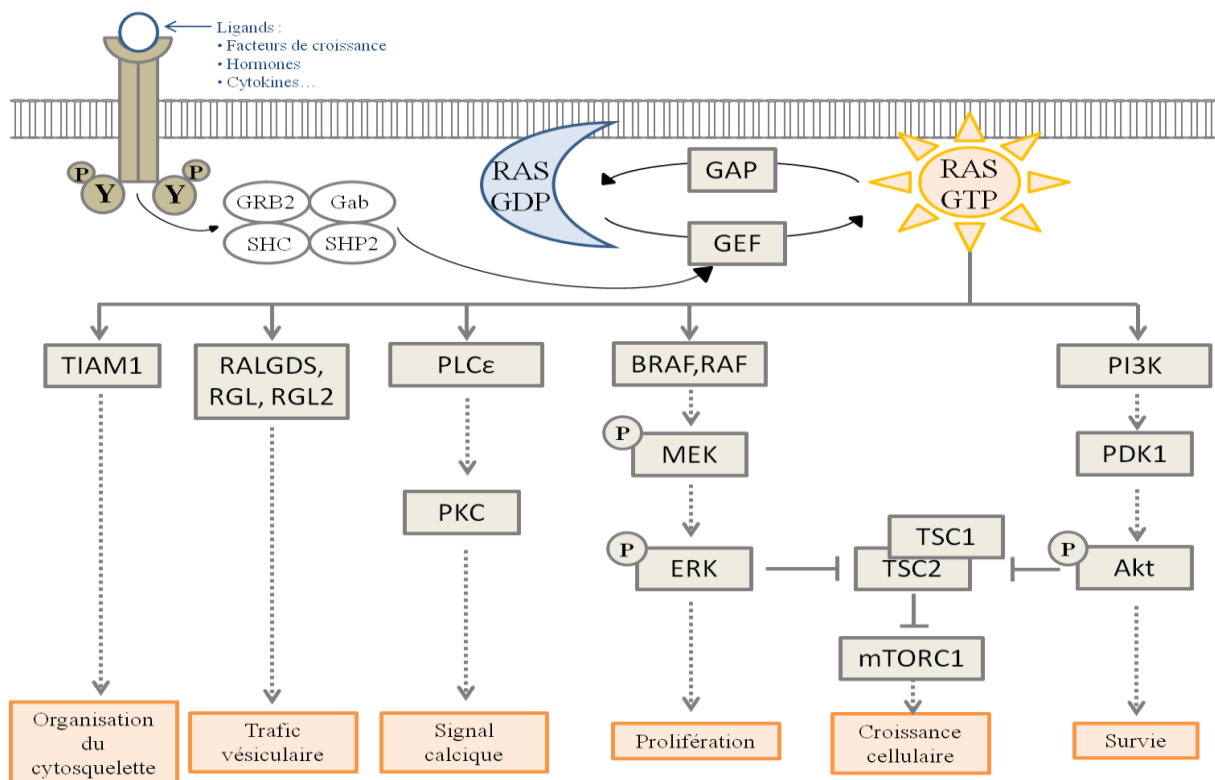


Figure 15 : Les voies de signalisation de RAS. RAS est activé par l'intermédiaire d'un récepteur à tyrosine kinase qui stimule la forme active de RAS liée au GTP, cette dernière permet la transduction du signal en interagissant avec des protéines situées en aval dans la voie de signalisation comme la voie TIAM1/Rac (organisation du cytosquelette), la voie RAL-GEF (trafic vésiculaire), la voie PLC/PKC (signal calcique), la voie MAPK (prolifération cellulaire) et la voie PI3K/akt (survie cellulaire).

RAS peut également activer une autre voie importante de signalisation qui est la voie PI3K/AKT présentée plus-haut (Shaw and Cantley, 2006). Ras stimule d'autres effecteurs comme la voie RAL-GEF qui intervient dans le trafic vésiculaire, ou la voie PLC/PKC qui régule le signal calcique, ou encore la voie TIAM1/Rac dans l'organisation du cytosquelette. Ras est un des oncogène les plus mutés dans les cancers (Roberts and Der, 2007). La protéine Ras mutée peut également conduire à d'autres types de maladies comme le syndrome de Costello. Il existe aussi des protéines ou des gènes qui régulent Ras et qui peuvent être mutés et ainsi influencer l'activité de Ras. C'est le cas du gène NF1 qui lorsqu'il est muté entraîne une accumulation de Ras lié au GTP, Ras reste donc en permanence sous sa forme active (Shaw and Cantley, 2006).

d. Sirtuines

Elles sont au nombre de 7 et présentent différentes localisations et fonctions. Les sirtuines sont étroitement liées à la régulation de la durée de vie des organismes vivants, et le fait qu'une restriction calorique prolonge la durée de vie (Heilbronn and Ravussin, 2003), suggère que le contrôle de la durée de vie par les sirtuines est associé à l'état métabolique. Les sirtuines interviennent ainsi dans régulation du métabolisme énergétique, du cycle cellulaire et dans la transcription de gènes puisque les sirtuines sont des histones désacétylases NAD-dépendantes (Sirt 1 Sirt 2, sirt 3, Sirt 5) ou des ADP-ribosyl transférase (Sirt 4, Sirt 6) (Kelly, 2010a, 2010b). Les sirtuines sont donc stimulées en fonction du rapport $NAD^+/NADH$ dans la cellule (Houtkooper et al., 2012)

Parmi les sept sirtuines identifiées, c'est la première qui a les fonctions les plus variées, sans doute parce qu'elle a fait l'objet des études les plus nombreuses. Les sirtuines 1, 3 et 4 coopèrent pour moduler le métabolisme énergétique. La privation en substrats active les sirtuines 1 et 3, ce qui a pour effet d'inhiber la lipogenèse et la glycolyse, mais active la biogenèse des mitochondries, la gluconéogenèse, le métabolisme énergétique et la sécrétion d'insuline (Houtkooper et al., 2012). Sirt1, Sirt6 et Sirt7 sont localisées dans le noyau. La sirtuine 1 possède de nombreuses cibles parmi lesquelles figurent les protéines FoxO3, PPAR γ , PGC1 α , UCP2, p53. D'une manière générale, sirt1 a un effet protecteur contre la sénescence, du fait qu'elle active le système de protection contre les radicaux libres. Sirt 1 stimule également la biogenèse des mitochondries. Dans le muscle strié, l'AMPK active Sirt1 via l'oxydation des lipides qui entraîne une augmentation du ratio $NAD^+/NADH$ (Cantó et al.,

2009) ou par la protéine Nampt qui est une enzyme essentielle à la production NAD^+ (Fulco et al., 2008). Comme la sirtuine 1, la sirtuine 6 protège contre la sénescence car la souris *sirt6*^{-/-} a une durée de vie très courte (4 semaines) (Mostoslavsky et al., 2006). La sirtuine 7 stimule la transcription des gènes ribosomiques par l'ARN polymérase I. Elle est abondante dans les cellules à prolifération rapide, comme celles du foie, du pancréas et des testicules, mais beaucoup moins dans les cellules en repos mitotique, comme celles du cerveau, des muscles et du cœur (de Oliveira et al., 2013). Sirt7 déacétyle p53, une étude a montré qu'une souris *sirt7*^{-/-} avait une hypertrophie cardiaque en lien avec une hyperacétylation de p53 (Vakhrusheva et al., 2008). Sirt2 est localisée principalement dans le cytosol et agit sur différentes histones. C'est un régulateur du cycle mitotique. Les cellules surexprimant le gène *sirt2* se divisent plus lentement que les cellules normales, parce que la phase M de leur cycle mitotique est allongée. Elle permet également la déacétylation de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) empêchant ainsi sa dégradation par ubiquitinylation (Jiang et al., 2011). Elle intervient aussi dans la lipogénèse en acétylant et en activant FoxO1 (Houtkooper et al., 2012).

Les Sirt3, Sirt4 et Sirt5 résident quant à elles dans les mitochondries. Sirt 3 active le cycle de Krebs via l'isocitrate déshydrogénase, la glutamate déshydrogénase, la succinate déshydrogénase, et les OXPHOS par le complexe I, le complexe II et III (Houtkooper et al., 2012). Les OXPHOS sont alors stimulées. L'activité de Sirt3 augmente lors d'une restriction calorique et diminue lors d'une alimentation riche (Hirschey et al., 2011a). Sirt3 intervient également dans la protection anti-oxydante car elle stimule la SOD2 qui est une enzyme clé dans la régulation des ROS. Il a été montré que les souris *Sirt3*^{-/-} sont obèses même en restriction calorique car *sirt3* active la β -oxydation par la long chain acyl CoA déshydrogénase (LCAD). Dans ce cas, il n'y a pas de β -oxydation des acides gras qui restent stockés (Hirschey et al., 2011b). La sirtuine 4 présente un rôle opposé à la sirtuine 3 car elle inhibe la glutamate déshydrogénase, ce qui empêche la conversion du glutamate en α -cétoglutarate. Il en résulte ainsi un ralentissement du métabolisme énergétique (de Oliveira et al., 2013). Une autre équipe a montré que mTORC1 par l'intermédiaire de CREB2 (cAMP-responsive element binding 2), inhibe Sirt4 ce qui permet l'activation de la glutamate déshydrogénase (Csibi et al., 2013). Sirt5 n'a qu'une seule cible connue pour le moment qui est CPS1 ; *sirt5* intervient donc dans la détoxification de l'ammoniac via le cycle de l'urée.

e. **FoxO**

Comme expliqué précédemment, la voie de signalisation PI3K/AKT, activée en réponse à l'insuline ou aux facteurs de croissance, permet la régulation de nombreux mécanismes cellulaires physiologiques comme la survie, la prolifération, le métabolisme et la réponse à différents stress. Parmi les cibles de cette voie se trouvent les facteurs de transcription de la famille FOXO (FoxO1, FoxO3, FoxO4, FoxO6). En l'absence de stimulation par des facteurs de croissance ou dans des conditions de stress, les facteurs de transcription FoxO se trouvent dans le noyau et entraînent l'expression de gènes impliqués, entre autre, dans l'arrêt du cycle cellulaire et la mort cellulaire (apoptose). En réponse à une stimulation par les facteurs de croissance, la sérine/thréonine kinase AKT phosphoryle directement les facteurs FoxO sur trois sites régulateurs (Thr32, Ser253, Ser 315 pour FoxO3) et entraîne leur exclusion nucléaire et leur dégradation, permettant la survie et la prolifération cellulaires. Les FoxO contrôlent l'arrêt du cycle cellulaire à la fois en phase G1 et en phase G2. Ces facteurs de transcription permettent également la réparation des dommages de l'ADN. L'activation anormale de la voie PI3K/AKT a été observée dans de nombreux cancers chez l'homme (Eijkelenboom and Burgering, 2013).

Lors d'un stress oxydatif, la voie Jun N-terminal kinase (JNK) est activée et régule positivement l'activité de la famille FoxO. La défense contre le stress oxydatif passe également par l'activation de PTEN qui est un très bon activateur des FoxO (Eijkelenboom and Burgering, 2013). Lors d'un stress énergétique, les FoxO peuvent être aussi activés par l'AMPK. En effet, l'AMPK peut soit phosphoryler directement FoxO3 sur trois résidus de sérine (Ser413, Ser588, Ser626) ou activer les sirtuines. Sirt1 ou sirt2 peuvent déacétyler les protéines FoxO qui sont normalement acétylées, notamment la protéine FoxO3a. Sirt1 en inhibant FoxO3a, induit un arrêt du cycle cellulaire, une réparation de l'ADN et une inhibition de l'apoptose (Brunet et al., 2004). La régulation des FoxO est complexe et impacte de nombreuses cibles impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire (p16, p27...), l'apoptose (TNF, BCL2L1...), le métabolisme (PEPCK, G6P...), la balance redox (SOD2, CAT...), la mitophagie (PINK1), le système immunitaire (IL7R...)... FoxO peut aussi interagir directement avec d'autre régulateur comme MYC. En effet, il semblerait que FoxO et MYC soient antagonistes (Jensen et al., 2011).

Comme indiqué précédemment, lorsque la voie PI3K/AKT est activée, les protéines de la famille FoxO sont séquestrées dans le cytoplasme afin de permettre la survie et la prolifération cellulaire.

f. HNF

La différenciation et la fonction des hépatocytes dépendent de la super-famille de récepteurs nucléaires: Hepatocyte Nuclear Factor (HNF) qui se compose de HNF1, 3 (FOXA), 6 (ONECUT), CCAAT/enhancer binding protein (CEBP) et de HNF4 (Watt et al., 2003). Des mutations dans ses gènes entraînent un diabète de type II (Ryffel, 2001). HNF1 possède deux isoformes α et β . HNF1 joue un rôle dans la régulation du métabolisme énergétique ainsi que dans la sécrétion des cellules β pancréatiques. En effet, les gènes cibles de HNF1 sont le transporteur du glucose 2, la pyruvate kinase, l'aldolase B, la 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A réductase et l'OGDH (Ryffel, 2001). HNF3 joue un rôle central dans la régulation du métabolisme et dans la différenciation de tissu métabolique comme le foie ou le pancréas. HNF3 se lie aux éléments *cis* d'une centaine de gènes qui codent pour des enzymes de la glycolyse ou de la gluconeogenèse. HNF3 possède 3 isoformes: FOXA1 (HNF3A), FOXA2 (HNF3B) et FOXA3 (HNF3G) (Kaestner, 2000). HNF4 possède trois isoformes α , β et γ . HNF4 est impliqué dans le développement embryonnaire, la différenciation des hépatocytes. Les gènes cibles de HNF4 sont le transporteur du glucose 2, la pyruvate kinase, l'aldolase B, l'OGDH et l'UCP2 (Ryffel, 2001). Une étude montre l'interaction de FoxO1 avec HNF4. Le resveratrol induit la déacétylation de FoxO1 via sirt1. FoxO1 déacétylé se lie au promoteur du gène de la glucokinase et à HNF4. La glucokinase est alors réprimée (Ganjam et al., 2009).

g. HIF

La limite de diffusion de l'oxygène dans les tissus est d'environ 150 μm et les cellules souffrent d'un manque d'oxygène dès 70 μm de distance d'un vaisseau sanguin (Vaupel, 2004). L'hypoxie active un facteur de transcription hétérodimérique alpha-beta, nommé hypoxia inducible factor (HIF). En présence d'oxygène, HIF est très instable et dégradé. Cette destruction est rendue possible par l'hydroxylation de HIF grâce aux prolyl hydroxylases PHD1, PHD2 ou PHD3 (Myllyharju, 2013). Ensuite le complexe pVHL (Von Hippel-Lindau) qui possède une activité E3-ubiquitine ligase, ubiquitinye HIF ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome. En condition d'hypoxie, HIF n'est plus dégradé, il est alors transloqué dans

le noyau pour s'attacher aux éléments de réponse hypoxique (HRE) de ses nombreux gènes cibles (Brahimi-Horn et al., 2007). Les ARNm codant les deux sous-unités de HIF-1 sont exprimés de façon constitutive et stable dans la plupart des cellules (Tora et al., 1996). Au niveau protéique, ARNT1/HIF-1s est lui aussi stable. En revanche, HIF-1 α est dégradé extrêmement rapidement en condition de normoxie (demi-vie de l'ordre de 5 min) par le système ubiquitine/protéasome (Huang et al., 1998; Salceda and Caro, 1997; Wang et al., 1995).

La stabilisation de HIF1- α stimule l'expression des transporteurs du glucose (GLUT1 et GLUT3) et de plusieurs enzymes glycolytiques, telles que l'hexokinase II, la phosphofructokinase, la pyruvate kinase et la lactate déshydrogénase (DeBerardinis et al., 2008). Ces changements induisent une entrée plus importante de glucose dans la cellule, une production de lactate accrue, de même qu'une production d'ATP par la glycolyse beaucoup plus importante. De plus, étant donné que la phosphorylation de la pyruvate déshydrogénase par la pyruvate déshydrogénase kinase inhibe l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs, la production d'ATP mitochondriale s'en trouve diminuée (Papandreou et al., 2006). Une étude récente de l'équipe de Jérôme Kluza et Philippe Marchetti montre une activation de la PDK3 par HIF1 α , HIF1 α se liant directement au promoteur de la PDK3. La PDK3 diminue l'activité de la PDH qui entraîne une diminution de l'activité des OXPHOS (Kluza et al., 2012). HIF1- α semble aussi induire une diminution de la biogénèse mitochondriale (Hervouet et al., 2008). L'accumulation de succinate dans le cytosol permet l'inhibition de la dégradation de HIF et favorise sa stabilisation (Pollard et al., 2005). Le facteur HIF peut aussi être régulé par des intermédiaires du cycle de Krebs. Koivunen et al. ont montré que le succinate et le fumarate inhibent l'activité des PHDs. Leurs résultats expliquent aussi que le fumarate peut induire l'expression de gènes hypoxiques en réduisant l'activité des PHDS ce qui aboutit à une réponse pseudo-hypoxique (Koivunen et al., 2007).

h. p53

TP53 est un gène suppresseur de tumeurs qui joue un rôle crucial dans le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose. Il code la protéine p53 qui est la protéine la plus fréquemment mutée dans les tumeurs (Sermeus and Michiels, 2011). p53 est activée lors d'un stress métabolique ou oxydatif, ou lors d'une hypoxie ou d'un dommage à l'ADN (Nakano et al., 2000). Le rôle de p53 dans la régulation de la glycolyse et des OXPHOS a été fortement

étudié. p53 fonctionne comme un suppresseur de tumeur qui peut réduire la glycolyse en diminuant l'entrée de glucose (en inhibant les transporteurs du glucose 1 et 4) (Schwartzberg-Bar-Yoseph et al., 2004), ou alors en inhibant directement les enzymes comme l'hexokinase II dont le promoteur du gène possède des éléments de réponse à p53 (Vousden and Ryan, 2009). Parallèlement p53 active les OXPHOS en stimulant la COX et sa protéine chaperonne SCO2 (Matoba et al., 2006). Lorsqu'il y a une perte de p53, cela induit un switch vers le glycolyse (Teodoro et al., 2006). p53 est également impliquée dans le métabolisme de la glutamine en surexprimant la glutaminase 2 (GLS2) (Gao et al., 2009). p53 peut être activé par l'AMPK pour permettre la survie cellulaire en réponse à un stress métabolique (Jones et al., 2005). Cependant, l'acétylation est un processus important dans la stabilisation et l'activation de p53. Il a été montré que Sirt1 peut déacétyler p53 et inhiber ainsi sa fonction (Luo et al., 2001).

i. MYC

MYC est un oncogène qui code le facteur de transcription N-MYC ou C-MYC, qui est souvent dérégulé dans les cancers (Dang et al., 2008). C-MYC régule des gènes et des micro-ARN impliqués dans le cycle cellulaire, le métabolisme du glucose ou de la glutamine. En effet, C-MYC peut stimuler la glycolyse en induisant l'expression des enzymes lactate déshydrogénase, pyruvate kinase, ou PDK1. Il peut aussi mimer un métabolisme hypoxique dans des conditions normoxiques puisque C-MYC stabilise HIF1 α et inhibe sa dégradation (Dang et al., 2008). Cependant, C-MYC peut également stimuler la biogénèse mitochondriale et la consommation d'oxygène mitochondriale. En effet, C-MYC régule TFAM, les sous-unités du complexe I, les UCP.... (Li et al., 2005). Plus récemment, il a été montré l'implication de C-MYC dans la régulation du métabolisme de la glutamine. Une augmentation de l'activité de C-MYC augmente les transporteurs plasmiques de glutamine, de la glutaminase mitochondriale 1 (GLS1, qui convertit la glutamine en glutamate dans la mitochondrie) (Gao et al., 2009; Wise et al., 2008). Dans des cellules transformées par C-MYC rendues dépendantes à la glutamine, la privation de glutamine induit l'apoptose (Wise et al., 2008). Ceci ouvre une nouvelle voie d'exploration thérapeutique. C-MYC joue un rôle prépondérant dans les cancers puisqu'il favorise entre autre l'épissage de l'isoforme M2 de la pyruvate kinase qui stimule la glycolyse anaérobie (David et al., 2010).

III. Concepts émergents en bioénergétique

1. Rigidité métabolique

Les différents tissus de l'organisme démontrent une préférence pour certains substrats énergétiques en fonction de leur équipement enzymatique et de leur physiologie. Par exemple, les adipocytes vont stocker les acides gras mais ne peuvent pas les consommer. De même, le cerveau qui utilise majoritairement du glucose et du lactate ne peut pas consommer non plus les acides gras. En revanche, le cœur utilise les acides gras pour produire de l'ATP. Le muscle squelettique (en fonction du type de fibres) consomme du glucose, du glycérol, des acides gras et certains acides aminés comme la valine. Le foie quant à lui stocke les acides gras mais aussi du glycérol et du glycogène. Les tissus possèdent ainsi une organisation moléculaire des voies métaboliques qui leur est spécifique et qui détermine leur capacité à stocker ou à transformer tels ou tels substrats énergétiques: c'est ce que l'on appelle la **rigidité métabolique**. Par exemple, les adipocytes vont stocker les acides gras car ils ne peuvent pas les consommer puisqu'ils n'ont pas la machinerie de la β -oxydation. Au sein d'un organisme entier, les tissus communiquent entre eux et s'échangent des substrats comme le cerveau qui consomme les corps cétoniques stockés dans le foie. De même, des travaux du laboratoire ont montré que la composition et l'activité de la chaîne respiratoire change en fonction des tissus (Benard et al., 2006a). En effet, le cœur et le muscle contiennent une plus grande quantité de complexes de la chaîne respiratoire, de cytochrome C que le foie, les reins ou le cerveau. Il y a également une organisation spatiale différente du réseau mitochondrial en fonction de ses tissus (Benard et al., 2006b).

2. Flexibilité métabolique

Dans certains cas comme le cancer ou des maladies métaboliques telles que le diabète, la rigidité métabolique n'est plus respectée et les voies biochimiques subissent des modifications destinées à maintenir l'homéostasie énergétique et de nombreuses biosynthèses. Etant donné la multitude des paramètres qu'une cellule doit maintenir, par exemple l'ATP, l'état REDOX (NADH/NAD^+), la synthèse d'acides nucléiques ou de phospholipides et la régénération des défenses anti-oxydantes, le remodelage métabolique peut être vu comme la résultante globale de nombreux changements concertés. Par exemple, si une cellule vient à manquer de glucose, la production d'ATP va devoir être compensée, mais aussi la synthèse de sérine qui s'effectue à partir de l'intermédiaire glycolytique, le 3PG. Dans ce cas, des voies de

survie peuvent se mettre en place, révélant par la même des circuits inconnus dont l'étude enrichie notre connaissance fondamentale du métabolisme et à partir desquels des voies thérapeutiques innovantes pourraient être envisagées.

Cette capacité à remanier les voies biochimiques du métabolisme pour contourner des obstacles et maintenir de nombreux objectifs biologiques constitue la **flexibilité métabolique**. Elle repose sur la capacité des cellules à modifier leurs circuits métaboliques en activant des voies compensatrices ou alternatives (non-canoniques) pour maintenir l'homéostasie énergétique et d'autres besoins. La cellule cancéreuse est un objet de choix pour l'étude de cette flexibilité car elle possède une capacité d'adaptation ultime, qui lui permet de croître dans des environnements contraignants. La flexibilité métabolique possède plusieurs déterminants :

- ❖ L'activation rapide de "switch", branchements et déviations par modification post-traductionnelle ou dégradation rapide d'enzymes nodaux. Par exemple, lors de l'hypoxie, la phosphorylation de la PDH inhibe les oxydations phosphorylantes. Le premier événement rapide est la stabilisation du facteur HIF1 α .
- ❖ Un système de senseurs de nombreux paramètres, comme l'état énergétique par l'AMPK ou l'alimentation en nutriments par le complexe mTORC1. Ces sentinelles activent des voies de signalisation aboutissant à une réorganisation des circuits métaboliques. L'AMPK stimule le catabolisme énergétique et bloque l'anabolisme par exemple.
- ❖ Des mutations génétiques. Dans certains cancers, la sélection de mutant de la SDH, de l'IDH ou de la FH permet une stabilisation de la voie HIF1 α et un "switch" glycolytique.
- ❖ La thermodynamique et la cinétique. En effet, le premier degré d'analyse du remodelage concerne la loi d'action de masse et la régulation enzymatique. Par exemple, un taux élevé de NADH bloque l'IDH et réduit l'activité du cycle de Krebs. De même, le citrate en s'accumulant bloque la PDH.
- ❖ Les seconds messagers comme le calcium ou les ROS fournissent aussi des moyens rapides d'activation du remodelage. Par exemple, le clivage de l'aconitase par les ROS

conduit à une extrusion du citrate vers le cytosol, puis à la synthèse de lipides. Dans ce cas, le glucose se retrouve transformé en graisse, comme dans le cas d'une hyperglycémie diabétique. L'effet de l'acétylation du complexe I, de la glutathionylation ou de la méthylation de certains enzymes reste à découvrir.

- ❖ L'expression de certaines isoformes permet aussi de modifier les voies biochimiques de transduction d'énergie. C'est le cas du "switch" moléculaire entre les sous-unités COX4-1 et COX4-2 activé par HIF1 α , mais aussi du switch PKM1/PKM2, LDHA/LDHB. De même la PEPCK qui est une enzyme de la gluconéogenèse qui transforme l'OAA en PEP (Cf. Chapitre I.6). L'isoforme mitochondriale dépend du GTP mitochondrial tandis que l'isoforme cytosolique ne dépend pas du GTP. En fonction du niveau énergétique, la cellule utilisera préférentiellement un isoforme plutôt qu'un autre (Stark and Kibbey, 2014).

3. Remodelage ou reprogrammation métabolique

La flexibilité métabolique est donc un "trait de caractère" de la cellule, qui décrit la facilité à opérer un remodelage des voies métaboliques au niveau biochimique. Ce remodelage requiert généralement une reprogrammation métabolique au niveau génétique, mais pas nécessairement (les modifications post-traductionnelles peuvent suffire). Les mécanismes mis en jeu lors d'un remodelage métabolique sont complexes et nécessitent une étude large spectre au niveau du protéome cellulaire par exemple, puis des modifications post-traductionnelles. Une analyse des flux de métabolites est aussi requise pour vérifier le chemin suivi par la glutamine, le glucose, le pyruvate, etc. La cinétique du remodelage peut présenter plusieurs phases, et là encore peu de données sont disponibles. Nous pensons que suite à un changement rapide d'état énergétique, causé par exemple par la disparition de glucose dans le microenvironnement, la cellule se tourne vers les voies métaboliques dont elle dispose pour pallier ce manque, par exemple la néoglucogenèse. Toutefois, si le manque de glucose perdure, les cellules cancéreuses qui ne sont pas programmées pour réaliser fréquemment la néoglucogenèse peuvent améliorer cette voie face à la pression de survie. Dans ce cas, la cellule améliore des voies préexistantes pour subvenir à un changement soudain. Cette « amélioration » inclut des déviations de voies, des branchements opportuns et de redirections de certains métabolites vers de produits finaux devenus indispensables dans ce contexte. Le

remodelage métabolique est une composante de la faculté adaptative cellulaire qui caractérise fortement les cellules cancéreuses.

Le remodelage métabolique a été décrit dans plusieurs situations, autres que le cancer, mais il est vrai que l'étude de ce phénomène est assez récente. Chez les animaux ectothermes (organismes dont la température corporelle est la même que celle du milieu extérieur) on peut observer une adaptation à des températures basses: il se produit alors une augmentation de la densité mitochondriale et de l'activité des enzymes des OXPHOS (Guderley, 2004) avec une augmentation des phospholipides insaturés (shift vers la synthèse de phosphatidylethanolamine) (Hazel, 1995). Une étude menée sur la truite montre qu'elle adapte son métabolisme au changement de température. Après 8 semaines à 15°C au lieu de 5°C, le métabolisme de la truite a subi un remodelage: il a un shift de la composition des acides gras des membranes car la quantité de diacylphosphatidylethanolamine (PE) /diacylphosphatidylcholine (PC) diminue tandis que leurs formes plasmogènes augmentent. La quantité de cardiolipine augmente également (Kraffe et al., 2007). D'autres travaux sur l'exercice physique montrent que le remodelage métabolique varie en fonction de l'intensité de l'exercice: lors d'un exercice intense et bref, il y a un faible découplage via l'expression d'UCP2 et d'UCP3 (Jose et al., 2013b; Schrauwen et al., 1999). Lors d'un exercice d'endurance il y a une activation de la biogenèse mitochondriale qui conduit à l'augmentation du nombre de mitochondries, ainsi qu'une augmentation de la proportion de fibres oxydatives dans le muscle (Holloszy and Coyle, 1984; Jose et al., 2013b). Le remodelage métabolique intervient aussi dans la régulation du système immunitaire comme la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes mémoires. Lors de cette différenciation, il se produit un shift métabolique vers la β -oxydation des acides gras (Pearce et al., 2009, 2013). De même, des cellules T devenues alloréactives (maladies autoimmunes) stimulent les OXPHOS, consomment le pyruvate et diminuent la β -oxydation (Gatza et al., 2011). Enfin, lors d'une inhibition de la chaîne respiratoire à la roténone ou au cyanure, mais aussi dans le muscle de patients atteints de maladie mitochondriale on observe une réorganisation du réseau mitochondrial et une activation de la biogenèse mitochondriale, c'est la plasticité mitochondriale (Benard et al., 2007, 2013). Nous détaillerons plus bas les différents types de remodelage métabolique décrits dans le cancer (effet Warburg, cycle de Krebs tronqué, glutaminolyse non-canonique, réponse à la privation en glucose ou en glutamine ; cf. Chapitre IV).

Ces différents exemples de remodelage métabolique décrit plus haut nécessitent l'intervention de voies de signalisation qui relient les différents types de stress énergétiques à des modifications de la mitochondrie et notamment les voies métaboliques qu'elle contient (Jose et al., 2013b). Par exemple, la diminution de la quantité d'oxygène stimule la voie de HIF1 α qui contrôle les isoformes de la COX4 par l'intermédiaire de la protéine LONP (Fukuda et al., 2007) (Cf. Chapitre II.1). De même, des facteurs de croissance activent la voie RAS qui stimule alors le facteur de transcription STAT3 responsable de la stimulation des OXPHOS par des mécanismes non précisés (Cf. Chapitre II.3).

IV. Remodelage et flexibilité métabolique dans le cancer

1. Le cancer

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormale au sein d'un tissu normal de l'organisme. Ces cellules dérivent toutes d'un même clone, la cellule initiatrice du cancer qui a acquis certaines caractéristiques lui permettant de se diviser indéfiniment et de pouvoir former des métastases. Le cancer est un terme général pour n'importe quelle maladie dans laquelle certaines cellules du corps humain se divisent d'une manière incontrôlée. Les nouvelles cellules résultantes peuvent former une tumeur maligne ou se propager à travers le corps et former des métastases. Hanahan et Weinberg ont initialement défini six points qui caractérisent une cellule cancéreuse (Hanahan et al., 2000): **1.** maintient des signaux de prolifération. **2.** insensibilité aux signaux anti-prolifératifs. **3.** résistance à l'apoptose. **4.** prolifération illimitée (perte de la sénescence). **5.** capacité à induire l'angiogenèse. **6.** capacité d'invasion tissulaire et diffusion métastatique. En plus de ses six caractéristiques, quatre nouvelles ont été définies (Hanahan and Weinberg, 2011): **7.** instabilité génomique et mutation. **8.** microenvironnement inflammatoire. **9.** échappement au système immunitaire. **10.** modification du métabolisme énergétique (**Figure 16**)

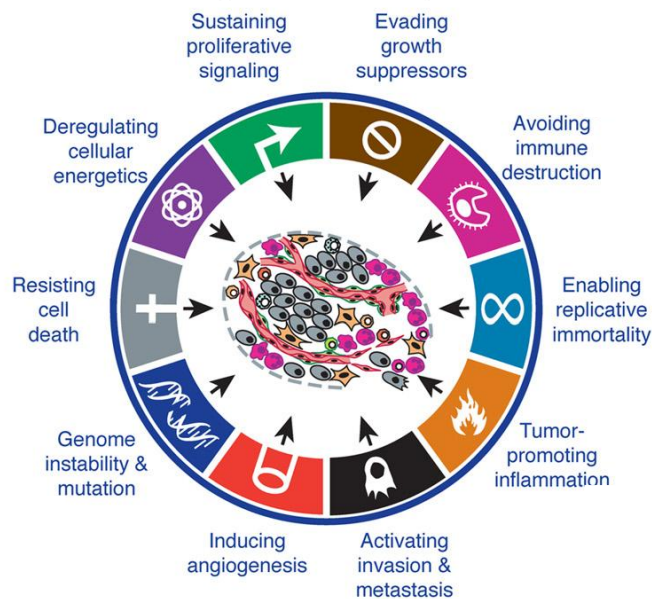


Figure 16 : Hallmarks of cancer (Hanahan and Weinberg, 2011) Hanahan et Weinberg ont initialement défini les dix caractéristiques d'une cellule cancéreuse : **1.** maintien des signaux de prolifération. **2.** insensibilité aux signaux anti-prolifératifs. **3.** résistance à l'apoptose. **4.** prolifération illimitée (perte de la sénescence). **5.** capacité à induire l'angiogenèse. **6.** capacité d'invasion tissulaire et diffusion métastatique. **7.** instabilité génomique et mutation. **8.** microenvironnement inflammatoire. **9.** échappement au système immunitaire. **10.** modification du métabolisme énergétique

En 2012, le nombre de nouveaux cas de cancer en France métropolitaine est estimé à 355 354 dont 200 350 chez l'homme et 155 004 chez la femme (<http://www.e-cancer.fr/>). Chez l'homme, les trois cancers les plus fréquents sont ceux de la prostate, du poumon et du côlon. Chez la femme, il s'agit des cancers du sein, du côlon et du poumon. Le nombre de décès par cancer en 2012 est estimé 148 000 décès dont 85 000 chez l'homme et 63 000 chez la femme. Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer chez l'homme devant le cancer colorectal et le cancer de la prostate. Chez la femme, le cancer du sein se situe au premier rang devant le cancer du poumon et le cancer colorectal. Les tumeurs

bénignes sont bien délimitées avec des cellules régulières à croissance lente, semblables au tissu sain. Les tumeurs malignes sont mal délimitées avec des cellules modifiées à croissance rapide et une possible invasion des tissus environnants avec des vaisseaux sanguins anormaux. Les tumeurs existent sous forme solide, liquide ou métastatique. Les tumeurs solides sont formées par des cellules cancéreuses entourées d'un tissu, le stroma, formé de cellules de soutien, des fibroblastes modifiés, infiltrés de vaisseaux sanguins qui apportent les sucres, les acides aminés et l'oxygène nécessaires à la croissance de la tumeur.

Les tumeurs solides peuvent se développer dans n'importe quel tissu: peau, muqueuses, os, organes, etc. et représentent 90% des cancers humains. Il existe 2 types de tumeurs: (i) les carcinomes issus de cellules épithéliales (peau, muqueuses, glandes) comme les cancers du sein, des poumons, de la prostate, de l'intestin. (ii) Les sarcomes issus de cellules des tissus conjonctifs, par exemple les cancers de l'os, du cartilage.

On distingue 2 types de cancers dits liquides: (i) les leucémies qui sont des cancers du sang et de la moelle osseuse. (ii) Les lymphomes qui sont des cancers du système lymphatique: les ganglions, mais aussi la rate, le foie.

Un cancer métastatique ou disséminé signifie que les cellules cancéreuses ont migré à travers le corps, par la voie des vaisseaux sanguins ou lymphatiques et ont colonisé un ou plusieurs autre(s) tissu(s), loin de la tumeur d'origine. Différents organes peuvent être touchés par ces métastases. Dans 10% des cas, les cancers sont héréditaires, dans la majorité des cas ce sont des événements sporadiques.

2. L'effet Warburg : glycolyse exclusive

En 1927, Otto Warburg a observé que les tumeurs (Ehrlich ascites carcinoma) consomment davantage le glucose et produisent l'ATP principalement via la glycolyse anaérobie malgré la présence d'oxygène (Warburg and Wind, 1927). Warburg décrit parallèlement une augmentation de la production de lactate et émet ainsi l'hypothèse que le cancer survient lorsque le métabolisme oxydatif mitochondrial est altéré. Beaucoup d'études par la suite se sont basées sur ce qui a été appelé l'effet Warburg. Des oncogènes stimulant la glycolyse ont été découverts, notamment des isoformes fœtales ré-exprimées dans le cancer, comme la PKM2 qui est moins rapide que la PKM1 permettant ainsi l'accumulation des

intermédiaires de la glycolyse qui seront utilisés par les voies anaboliques pour permettre la prolifération (Ward and Thompson, 2012). L'effet Warburg soulève aussi l'hypothèse de mitochondries dysfonctionnelles pour expliquer pourquoi le pyruvate n'est pas dégradé dans le cycle de Krebs. Dans les années 90, il a été démontré que cette dysfonction mitochondriale pouvait être due à l'inhibition de la PDH par surexpression de la PDK1 (contrôlé par HIF1 α), la réduction de la biogénèse mitochondriale (du à l'inactivation de p53) ou de l'inhibition de l'activité de la chaîne respiratoire (déclenchée par p53 muté via SCO2 et par HIF1 α via un switch d'isoformes de la COX4A-1/2). L'activation de la voie PI3K/Akt favorise aussi la glycolyse et l'entrée du glucose dans la cellule lors de l'effet Warburg. En effet, Akt permet l'augmentation du nombre de transport de glucose à la membrane ce qui permet une plus grande entrée de glucose dans la cellule. Akt favorise la glycolyse (et donc l'effet Warburg) en stimulant certaines enzymes comme l'hexokinase et la phosphofructokinase 1. Akt intervient aussi dans la synthèse de lipides à partir du glucose.

Une analyse récente basée sur un modèle informatique montre que l'effet Warburg est possible grâce à la régulation de certaines enzymes comme l'hexokinase II (HKII), la phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1), la phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) et la glyceraldéhyde phosphate deshydrogénase (GAPDH). L'inhibition de ses quatre enzymes entraîne une diminution de la production de lactate avec une augmentation de la respiration cellulaire. Une diminution de la capacité de migration tumorale est également observée. Certaines enzymes sont donc essentielles à l'effet Warburg (Yizhak et al., 2014). L'AMPK, qui est le senseur énergétique de la cellule, exerce un effet "anti-Warburg". En effet, lorsqu'il y a un manque d'ATP, l'AMPK va activer la production d'ATP via les OXPHOS plutôt que par la glycolyse (Cf. Chapitres I.2 et I.4). Faubert et al. montrent que l'inhibition de l'AMPK dans des cellules de lymphome provoque un switch vers la glycolyse avec augmentation d'entrée de glucose, du flux de carbones vers la lactate et des intermédiaires de la glycolyse pour la synthèse de lipides. Ce switch est HIF-dépendant (Faubert et al., 2013).

3. Le cycle de Krebs tronqué : prédominance des voies anaplerotiques

Les travaux récents sur l'effet Warburg montrent que les mitochondries ne sont pas inactives dans les cellules cancéreuses présentant ce phénotype, mais plutôt qu'elles présentent une faible efficacité (Bellance et al., 2009; Jose et al., 2012). Les raisons de cette efficacité diminuée sont multiples. Certains auteurs ont identifié des mutations dans l'ADN

mitochondrial en lien avec une activité diminuée des complexes de la chaîne respiratoire dans le cancer du rein notamment (Alazard et al., 2002; Mayr et al., 2008). D'autres études plus récentes montrent que le cycle de Krebs qui fournit normalement une grande partie du NADH à la chaîne respiratoire, subit des modifications dans le cancer. Le terme de cycle de Krebs tronqué fut introduit et nous pouvons citer deux exemples où cela fut décrit.

Dans le diabète, l'hyperglycémie conduit au clivage de l'aconitase. Quand l'aconitase est clivée (Bulteau et al., 2003), le citrate s'accumule dans la matrice mitochondriale, puis il est exporté dans le cytosol par un transporteur qui lui est dédié. Dans le cytosol, l'enzyme ATP-citrate lyase (ACLY) transforme le citrate en oxaloacétate et en acétyl-CoA. L'acétyl-CoA permet une synthèse de lipides ou une acétylation des histones. Dans certains cancers, une troncation du cycle a lieu, mais par des mécanismes différents. Ici, le cycle est alimenté par la glutamine qui rentre au niveau de l' α -cétooglutarate, puis en situation de rapport NADH/NAD⁺ élevé (chaîne respiratoire inefficace), l' α -cétooglutarate donne de l'isocitrate et du citrate. Ce citrate sort de la mitochondrie et génère de l'acétyl-coA et de l'oxaloacétate. L'oxaloacétate rentre quant à lui dans la néoglucogenèse (Hatzivassiliou et al., 2005). Cette troncation du cycle de Krebs aboutit ainsi à la synthèse de lipides à partir de la glutamine par l'isocitrate déshydrogénase 3 (IDH3) qui permet la remontée à l'envers du cycle.

Dans certaines lignées cancéreuses, il a été observé que la glutamine est plus consommée que n'importe quel autre acide aminé. Une analyse RMN au ¹³C menée sur des glioblastomes indique que 60% de la glutamine produit du lactate à partir de l'enzyme malique qui transforme la malate en NADPH, CO₂ et pyruvate. Ce pyruvate est alors catalysé en lactate par la lactate déshydrogénase. Le groupe de DeBerardinis montre également que 25% de la glutamine fournit les carbones pour la synthèse des acides gras en plus du NADPH généré par l'enzyme malique. La glutamine est donc la deuxième source de carbones pour les acides gras après le glucose (DeBerardinis et al., 2007b). La glutamine est également la source majoritaire de carbones pour former le pool d'oxaloacétate nécessaire à la synthèse des acides gras (Wise and Thompson, 2011). De nombreux cancers comme le cancer du pancréas, le glioblastome multiforme, les leucémies myéloïdes aigues et le cancer du poumon à petites cellules montrent une sensibilité à la privation en glutamine. Le métabolisme de la glutamine est donc une cible thérapeutique importante (Cf. Chapitre VI.2). L'équipe de DeBerardinis montre qu'un remodelage métabolique peut également avoir lieu lors d'une privation en substrat comme la glutamine. La protéine Hace1, qui appartient à la famille des HETC E3

ligase, est un suppresseur de tumeur muté dans des tumeurs de Wilms (cancer du rein le plus courant chez les enfants). Hace1 ubiquitinye Rac1 ce qui entraîne sa dégradation. Rac1 est impliquée dans la régulation des ROS en régulant les NADPH oxydases. Dans les tumeurs de Wilms, l'absence de Hace1 permet l'activation de Rac1 qui entraîne une augmentation des ROS. Le métabolisme de la glutamine régule la balance REDOX (Cf. Chapitre I.9) car il y a production de NADPH ce qui permet de réguler la production de ROS. Ils ont montré que les MEFs Hace1^{-/-} sont plus sensibles à la privation en glutamine que les MEFs contrôles. Au final, les MEFs Hace1^{-/-} vont adapter les voies métaboliques afin de contrebalancer l'augmentation des ROS (due à la perte de Hace1) en devenant dépendantes à la glutamine (Cetinbas et al., 2014). Une autre étude du même groupe montre que la privation de glutamine sur des glioblastomes (lignée cellulaire et xénogreffe) entraînent une modelage métabolique passant par une augmentation de la pyruvate carboxylase (Cheng et al., 2011).

4. Les cancers oxydatifs (FAO).

Toutes les cellules cancéreuses ne se conforment pas à l'effet Warburg et présentent une activation du système OXPHOS plutôt que son inhibition. Beaucoup d'études ont été menées montrant l'existence de tumeurs dites « oxydatives » *in vitro* et *in vivo* (Jose et al., 2011). Déjà en 1976, Reitzer écrivait "*in HeLa cells glutamine provides more than half of the cellular energy by aerobic oxidation from citric acid cycle metabolism when glucose is present* » (Chem et al., 1979). Il soumet l'hypothèse que le glucose, la glutamine, l'hydroxybutyrate et le palmitate peuvent servir à la production énergie et à l'anabolisme (synthèse de lipides et de cholestérol). L'oxydation du palmitate et de l'hydroxybutyrate sert à produire de l'ATP dans des hépatomes de Morris fraîchement excisés (Morton et al., 1976). Les déterminants moléculaires de ce phénotype oxydatif incluent une activation de la biogenèse mitochondriale, l'oxydation des acides gras, une stimulation des voies canoniques et non-canoniques de la glutaminolyse et de la dégradation des acides aminés. Ce phénotype oxydatif est retrouvé dans de nombreux cancers comme les lymphomes, les mélanomes, les glioblastomes et le cancer du sein. Certains types de cellules cancéreuses utilisent davantage les OXPHOS que la glycolyse pour produire l'ATP (Herst and Berridge, 2007). Un grand nombre de cellules cancéreuses peuvent aussi survivre et proliférer dans des milieux de culture qui sont dépourvus de glucose (Rossignol et al., 2004), mais cela requiert un profond remodelage métabolique que nous avons analysé dans la partie 2 des résultats. Quelle source

d'énergie est utilisée en aglycémie ? Comment s'opère l'anabolisme normalement issu du glucose ?

Peu de choses sont connues quant à l'utilisation des acides gras, des acides aminés ou des corps cétoniques comme substrats énergétiques par différents types de tumeurs, et les recherches actuelles tentent de répondre à ces questions, qui sont difficiles à étudier *in vivo* (Martinez-Outschoorn et al., 2012a). Des avancées importantes voire majeures dans le remodelage métabolique ont été présentées par le groupe de R. DeBerardinis récemment. Ces auteurs ont observé une destinée différente du glucose et de la glutamine *in vitro* et *in vivo* sur des tumeurs humaines dans le cerveau. En 2012, ce groupe explique que l'oxydation du glucose par la mitochondrie est active dans les glioblastomes de cerveau de souris *in vivo* (Marin-Valencia et al., 2012), confrontant directement l'hypothèse de Warburg. Le glucose est notamment converti en CO₂ et en glutamine dans cette étude, posant de nouvelles bases de la compréhension du métabolisme tumoral. De même des analyses de xénogreffes de gliomes humains montrent que la glutamine peut régénérer le glucose par la voie de la néoglucogenèse. Cette néoglucogenèse s'effectue normalement dans le foie mais les cellules cancéreuses du cerveau ont subi une reprogrammation métabolique et sont donc capables de réaliser la néoglucogenèse à partir de la glutamine. La glutamine est donc un substrat énergétique et anabolique important pour les tumeurs du cerveau (Martinez-Outschoorn et al., 2012a).

Dans ce paragraphe sur les cancers oxydatifs, nous pouvons aussi mentionner les études qui montrent que l'inhibition des OXPHOS altère la viabilité cancéreuse. Tout d'abord, les travaux de Weinberg sur un modèle murin d'activation de KRAS a révélé que des mitochondries fonctionnelles sont requises pour que la tumorigenèse se réalise pleinement (Weinberg et al., 2010). De même, l'inhibition génétique du complexe I par des mutations dans l'ADN mitochondrial a permis de proposer le modèle d'oncojanus (Gasparre et al., 2011). Il est possible d'inhiber graduellement le complexe I en faisant varier le taux d'hétéroplasmie qui correspond à la coexistence d'ADNmt sauvage avec de l'ADN mutant. G. Gasparre montre que si la tumeur tend vers l'homoplasmie (100% d'ADNmt muté), il y a une régression tumorale et à l'inverse si la tumeur tend vers l'hétéroplasmie (taux de mutation proche de 70- 80%) sa croissance est accélérée. De plus, si on place les cellules mutées dans un milieu de culture qui les oblige à utiliser les OXPHOS seules les cellules ayant un taux de mutation inférieur au seuil de mutation du complexe I (80 %) survivent (Gasparre et al., 2011). Dans une étude plus récente, ce groupe a étudié l'effet de diverses mutations (sévères ou non)

du complexe I sur le métabolisme des ostéosarcomes. Il apparaît que la dysfonction du complexe I la plus sévère entraîne un remodelage métabolique qui passe par une augmentation de la glycolyse et une activation de l'AMPK. Les cellules ayant une forte altération du complexe I présentent une réduction du potentiel tumorigène comparativement à des cellules ayant une altération moyenne du complexe I. Le taux de mutation de l'ADNmt joue donc un rôle central dans la progression et la sévérité du cancer (Iommarini et al., 2014).

5. Combien de sous-types bioénergétiques de cancers (glycolytiques, oxydatifs, mixtes ?)

Il existe différents types de cancers au niveau du métabolisme énergétique. Certains vont être glycolytique et d'autres plutôt oxydatifs. Cela a été montré d'abord sur des lignées cellulaires comme dans la lignée HLF-A qui produit 90% de son ATP par la glycolyse et qui présente donc un phénotype Warburg (Bellance et al., 2009b). A l'inverse, il existe des lignées cellulaires cancéreuses oxydatives comme les cellules MFC-7 (adénocarcinome épithélial de la glande mammaire), qui produisent 80% de leur ATP par la mitochondrie (Guppy et al., 2002), des cellules HeLa (cancers de l'utérus) et des HEK293 (cellules embryonnaires de rein) qui sont à 60% oxydatives (Gatenby and Gillies, 2004), et dans des cellules d'hépatome à 40% (Nakashima et al., 1984). A ce jour, peu d'études ont été réalisées sur des tumeurs *ex situ* ou excisées, si bien que notre vision du métabolisme énergétique cancéreux pourrait être biaisée par le système d'analyse le plus courant, les cellules cultivées dans un milieu riche en glucose, en absence de stroma et de communication intercellulaire. Cependant le groupe de Nika Danial a montré à partir de biopsies de patients atteint d'un lymphome qu'il existe deux populations tumorales dont une oxydative qui utilise les OXPHOS pour produire l'ATP nécessaire à la prolifération tumorale (Caro et al., 2012). L'équipe de Herlyn étudie la résistance à un traitement contre la mutation BRAFV600E dans des mélanomes. Ils montrent ainsi que la résistance au traitement est due à une sous-population mutée pour JARID1B (histone déméthylase) qui présente un phénotype oxydatif (Roesch et al., 2013). Peu de données existent cependant pour les tumeurs solides.

Les cellules cancéreuses adaptent également leur métabolisme en fonction de leur environnement (Cf. Chapitre IV.4). Une analyse par RMN menée sur trois lignées cellulaires *in vitro* de cancer colorectal a montré qu'elles présentent un phénotype Warburg lorsque la

concentration d'oxygène est normale. En condition d'hypoxie, une des trois lignées est très affectée, mais conserve le phénotype Warburg tandis que les deux autres lignées s'adaptent mieux à l'hypoxie et basculent leur métabolisme vers les OXPHOS malgré la faible concentration d'oxygène. En condition de normoxie, LS1034 montre un effet Warburg moins prononcé que les deux autres lignées car LS1034 a une activité plus importante du complexe IV par rapport aux deux autres lignées. Cependant en condition hypoxique, LS1034 devient la lignée la plus glycolytique par rapport aux deux autres lignées (Abrantes et al., 2014). Ceci pourrait être lié au shift entre les sous-unités COX4-1 et COX4-2 en condition d'hypoxie (Fukuda et al., 2007). Des lignées cellulaires de tumeurs d'humaines ou de souris (HL60, HeLa, 143B, and U937) utilisent les OXPHOS pour produire l'énergie pour leur croissance. Lorsque ces cellules sont déplétées en ADN mitochondrial, rendant la chaîne respiratoire non-fonctionnelle (HL60p^o, HeLa^o, HeLaS3p^o et 143Bp^o), 98 à 100% des cellules deviennent glycoliques : la flexibilité métabolique permet aux cellules de s'adapter à leur environnement pour survivre (Herst and Berridge, 2007). Une étude menée sur des cellules cancéreuses exprimant une forme mutée du complexe III de la chaîne respiratoire (déficiente) a révélé un remodelage métabolique important. Ces cellules peuvent survivre via la réduction carboxylative de la glutamine, avec une entrée anaplérotique de la glutamine dans le cycle de Krebs et une fuite du citrate qui sert à alimenter la synthèse de lipides (Mullen et al., 2012).

6. Couplage et symbiose métabolique

Pierre Sonveaux propose, une fois, l'existence d'un couplage métabolique entre les cellules cancéreuses localisées dans des zones en hypoxie et les cellules cancéreuses ayant accès à l'oxygène. En effet, en fonction de leur localisation dans la tumeur les cellules cancéreuses ne reçoivent pas toutes le même apport en nutriments ou en oxygène. Les cellules proches des vaisseaux sanguins sont mieux oxygénées et produisent leur énergie par les OXPHOS tandis que les cellules plus éloignées de la circulation sanguine sont plutôt hypoxiques et se servent de la glycolyse pour transduire de l'énergie. Les cellules hypoxiques/glycolytiques produisent du lactate qui est relargué dans le milieu extracellulaire. Ce lactate est alors importé par les cellules oxygéné/oxydative afin d'être catalysé par le cycle de Krebs et produire l'énergie par les OXPHOS. Il y aurait donc un échange métabolique entre les deux types de cellules tumorales. Les cellules oxydatives utilisent préférentiellement le lactate même en présence de glucose, ce qui permet la diffusion du glucose jusqu'aux cellules en hypoxie qui ont besoin de glucose pour transduire l'énergie par le flux glycolytique (Dhup

et al., 2012b; Nakajima and Van Houten, 2013; Sonveaux et al., 2008a). Ce couplage métabolique repose notamment sur l'expression préférentielle des transporteurs du lactate (MCT). En effet, le MCT4 se situe sur les cellules hypoxiques (Chiche et al., 2012) et permet l'export du lactate dans le milieu extracellulaire. Ce lactate est importé dans les cellules oxydatives via le MCT1 (Sonveaux et al., 2008a). De plus l'équipe de Sonveaux a montré que le transporteur au lactate MCT1 augmentait lors d'une privation en glucose dans le cancer du sein, suggérant que le lactate sert de substrat alternatif pour pallier le manque de glucose (Boidot et al., 2012). Une symbiose métabolique entre la tumeur et son microenvironnement a également été démontrée par l'équipe de Lisanti (Cf. Chapitre IV.4)

7. Oncométabolites

Ces dernières années, il est apparu que des altérations des voies du métabolisme énergétique pouvaient conduire à l'accumulation de métabolites possédant un effet de modulateur génétique (ou épigénétique) via leur action sur des facteurs de transcription et sur des méthylases. C'est le cas du succinate, du fumarate, de l' α -cétoglutarate ou encore du pyruvate. Par exemple, une mutation de l'IDH1 ou de l'IDH2 produit un métabolite particulier: le 2-hydroxyglutarate (2-HG). Cet analogue de l' α -cétoglutarate permet une stabilisation du facteur d'hypoxie HIF et des modifications épigénétiques notamment en augmentant la méthylation des îlots CpG et des histones. Le 2-HG est un oncométabolite qui joue un rôle dans la reprogrammation épigénétique dans des cancers associés à une mutation de l'IDH (Yang et al., 2013). Il existe également deux autres oncométabolites: le succinate et la fumarate (Xiao et al., 2012). Une mutation de la SDH entraîne une accumulation de succinate tout comme une mutation de la FH aboutit à l'accumulation du fumarate. Le succinate et la fumarate jouent aussi un rôle dans la reprogrammation épigénétique (Yang et al., 2013). Killian et al. ont montré l'existence d'une hyperméthylation dans les cancers SDH mutés (Killian et al., 2013). Le fumarate peut se lier aux résidus cystéines. Lorsqu'il est accumulé, le fumarate se lie au glutathion ce qui forme la fumarate-glutathion (GSF). La GSF est alors prise en charge par la glutathion réductase ce qui entraîne une augmentation des ROS mitochondriaux et une diminution du taux de NADPH (Sullivan et al., 2013). Le succinate et la fumarate peuvent comme le 2-HG stabiliser HIF en inhibant les PHDs (Yang et al., 2013), ce qui stimule la glycolyse et l'angiogenèse.

8. Addictions métaboliques

Certains oncogènes peuvent induire une addiction métabolique, c'est à dire une grande dépendance de la cellule à un substrat donné. Par exemple, Elstrom et al. ont montré qu'une activation oncogénique de AKT induit un effet Warburg avec une addiction au glucose (Elstrom et al., 2004). Il existe également une addiction aux acides gras. C'est le cas de lignée cellulaire du cancer du pancréas dont la prolifération augmente en présence d'acides gras par rapport aux cellules saines (Clerc et al., 1991). Des souris avec un cancer du pancréas muté KRAS nourrit avec un régime riche en graisse favorise la progression tumorale en lien avec un remodelage métabolique. En effet, il y a une augmentation des transporteurs des acides gras ainsi que des enzymes de la β -oxydation (Khasawneh et al., 2009). Les cellules cancéreuses peuvent aussi être dépendantes aux acides aminés comme la glutamine. Wise et al. expliquent qu'une activation de l'oncogène MYC stimule la glutaminolyse et rend les cellules cancéreuses dépendantes à la glutamine (Wise et al., 2008). De plus, Wise et al. expliquent que des cellules hypoxiques privées de glucose, deviennent dépendantes à la glutamine pour produire le citrate par la voie de la carboxylation réductive. HIF peut également maintenir cette addiction même en condition de normoxie (Wise et al., 2011). Dans une lignée d'adénocarcinome du pancréas muté KRAS, la voie de la glutaminolyse non canonique est aussi stimulée (utilisation de l'aspartate aminotransférase au lieu de la glutamate déshydrogénase) ce qui rend là encore aussi les cellules dépendantes à la glutamine (Son et al., 2013). D'autres études montrent une addiction à un autre acide aminé: la sérine. Dans des xénogreffes de cancer du sein, la PHGDH (première enzyme de la voie de biosynthèse de sérine, Cf. Chapitre I.12) est surexprimé permettant un apport important de sérine entraînant la prolifération tumorale. Lorsque la PHGDH est inhibée, la prolifération tumorale est ralentie due à un manque de sérine (Chen et al., 2013). La PHGDH est également mutée dans les mélanome et une inhibition de la PHGDH ralentie la prolifération des cellules cancéreuses (Locasale et al., 2011)

V. Déterminants du remodelage métabolique dans le cancer

1. Oncogènes et suppresseurs de tumeurs

La tumorigenèse est généralement initiée par l'apparition de mutations activatrices sur un oncogène ou bien par l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. L'apparition de tumeurs peut s'expliquer par la mutation d'oncogènes et/ou des gènes suppresseurs de tumeurs. Ces mutations surviennent à la suite de stress environnementaux (UVs, carcinogènes

chimiques....), et via une augmentation de la concentration des ROS, eux-mêmes générés par l'activité métabolique de la cellule ou par des agents physiques comme les radiations. Un oncogène est un gène capable de conférer un phénotype cancéreux à une cellule normale, en induisant, entre autre, une prolifération illimitée. Il existe différents types d'oncogènes comme des facteurs de croissance (VEGF...), des récepteurs à activité tyrosine kinase, des protéines de transduction de signal (Akt, Ras...) ou bien des facteurs de transcription (c-myc...). Ces différentes protéines ont normalement une activité contrôlée mais elles peuvent être constitutivement activées au sein des tumeurs. L'inhibition des gènes suppresseurs de tumeur est expliquée par les mêmes mécanismes que ceux responsables de l'activation des oncogènes à la différence que les mutations rencontrées induisent une perte de fonctionnalité de la protéine.

L'AMPK est située au centre de la suppression de tumeur en régulant la croissance et la prolifération cellulaire en réponse à un stress énergétique. L'AMPK est rarement mutée dans les cancers, mais son activité se trouve souvent dérégulée (Faubert et al., 2014a). Dans 90 % des cas d'une cohorte de patients atteint de cancer du sein primaire, il y a une diminution de l'activité de l'AMPK (Hadam et al., 2009). Cette dérégulation est notamment due aux protéines qui régulent son activité comme LKB1 ou TAK1. LKB1 est un suppresseur de tumeurs. Des mutations somatiques de LKB1 ont été trouvées dans des cancers du poumon et de l'utérus. LKB1 peut être mutée directement, ou LKB1 peut être lui même inhibé par une mutation de BRAFV600E notamment dans les mélanomes (Zheng et al., 2009). Dans certains cas comme le cancer du poumon, LKB1 est fréquemment muté mais l'AMPK n'est pas inhibée car elle peut être activée par d'autres effecteurs. TAK1 est muté dans 30 % des cancers de la prostate. Dans des souris déficiente en TAK il y a une accumulation de lipides et une inhibition de l'autophagie car il y a répression de l'AMPK (Inokuchi-Shimizu et al., 2014). L'AMPK peut être un régulateur négatif (suppresseur de tumeur) ou positif (oncogène) du cancer en fonction du contexte. Liang et Mills propose une théorie selon laquelle une activation modérée de l'AMPK la rendrait oncogénique tandis qu'une activation plus importante ou plus longue favoriserait sa fonction de suppresseur de tumeurs (Liang and Mills, 2013). Dans des souris déficientes en AMPK, la perte d'AMPK seule n'induit pas une tumorigénèse spontanée, mais cela conduirait à l'activation de c-myc qui peut induire la tumorigénèse (Faubert et al., 2014a). Faubert et al. ont montré qu'il existe, dans les cellules déficientes en AMPK, un shift métabolique vers l'effet Warburg. Une déficience en LKB1

aboutit au même phénomène (Faubert et al., 2014b). Phoenix et al. ont montré que la délétion de la sous-unité $\alpha 2$, et non $\alpha 1$, augmentent la susceptibilité de transformation des fibroblastes murines induit par HRAS_{G12V} (RAS actif) *in vitro* et *in vivo*. Les isoformes de l'AMPK ont donc un rôle important en tant que suppresseur de tumeur en plus de leurs rôles de senseur de l'énergie (Phoenix et al., 2012).

Il existe de nombreux oncogènes mais nous ne pourrions pas tous les citer ici. Cette thèse va s'intéresser plus particulièrement à l'oncogène HRAS (Cf. Résultats partie 1). Feramisco et al. en 1984, ont démontré que le caractère oncogénique de RAS puisqu'il est suffisant pour induire la prolifération des cellules quiescentes (Feramisco et al., 1984). Au fil des études, il a été montré que RAS active différents mécanismes afin de diriger la croissance tumorale. Des 3 isoformes principales de RAS, une mutation de KRAS survient dans 20 % des cancers et plus fréquemment dans des cancers où le taux de mortalité est élevé comme le cancer du pancréas (90%), le cancer colorectal (40%) et celui du poumon (25%) (Russo et al., 2014). NRAS est souvent muté dans les leucémies myéloïdes et les mélanomes (20%) tandis que HRAS est retrouvé muté dans le cancer de la vessie (Bos, 1989). Les mutations de RAS les plus fréquentes sont des substitutions d'acides aminés sur les codons 12, 13 et 61 comme la substitution de la glycine pour la valine (G12V) ou l'aspartate (G12D), le codon 12 étant le plus fréquemment muté (Braun and Shannon, 2008; Omerovic et al., 2008; Pylayeva-Gupta et al., 2011). La substitution d'un acide aminé au sein du codon 12 entraîne une modification de la séquence de liaison au GTP en empêchant l'accès d'une molécule d'eau au site catalytique de RAS (Estate et al., 1999). Par conséquent l'hydrolyse du GTP est impossible, RAS reste lié au GTP, et RAS reste donc sous sa forme active (Scheffzek, 1997). La substitution d'un acide aminé par un autre est important car par exemple dans le cas de cancer colorectal ou du poumon KRAS_{G12V} est plus associé à un mauvais pronostic que KRAS_{G12D} (Andreyev et al., 1998; Keohavong et al., 1996). De même, pour HRAS_{G12V} qui présente une liaison plus forte avec le GTP et une activité GTPase plus faible d'un quart que celle de HRAS_{G12D} (Estate et al., 1999).

2. Aspects dynamiques et quantitatifs

Des modèles d'études ont été créés afin d'étudier l'impact des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs sur la cellule. Weinberg a transformé des cellules pulmonaires non cancéreuses (IMR90) en cellules cancéreuses (Hahn et al., 1999). Pour cela il a introduit l'antigène T du virus SV30 (small T) qui inhibe pRb (protéine du rétinoblastome ; suppresseur

de tumeurs) et p53 (qui est aussi un suppresseur de tumeur). Il a introduit ensuite H-tert, une télomérase oncogénique participant à l'immortalisation des cellules cancéreuses. Le dernier oncogène inséré dans ce modèle est HRAS. Durant ma thèse, le modèle de Weinberg a été utilisé afin de comprendre l'impact de HRAS_{G12V} sur le métabolisme énergétique (Cf. Article 1). En parallèle de cette activation séquentielle d'oncogènes, certains auteurs ont proposé une reprogrammation métabolique organisée sous la forme d'une succession de vagues (Smolková et al., 2011). Il s'agit donc d'une hypothèse que nous avons notamment étudié dans l'article 1 de cette thèse (Cf. Résultats partie 1). La première vague correspond à l'activation de cellules souches cancéreuses porteuses de mutations. Cette étape d'initiation de la tumeur est généralement caractérisée par un phénotype de type Warburg. Il y a notamment une activation de Myc et de Akt qui stimule l'entrée de glucose dans la cellule et la synthèse des acides gras. p53 est aussi inactivée à ce stade précoce. Le deuxième vague correspond à l'arrivée de l'hypoxie. Les cellules cancéreuses sont en hypoxie avec un phénotype Warburg entier. HIF étant stabilisé, il y a stimulation de la PDK qui inhibe la PDH, le pyruvate n'est donc plus dévié vers les OXPHOS. HIF stimule aussi la LDH, la PKM2 et LONP qui permet le shift COX4-1 vers COX4-2. AMPK fait alors son entrée avec une stimulation de la β -oxydation des acides gras. Le glucose étant fortement consommé par ses cellules en prolifération les cellules vont être soumises à l'aglycémie qui correspond à la troisième vague. Myc, cette fois-ci va favoriser la voie de la glutaminolyse avec un cycle de Krebs tronqué. La mitochondrie recommence à devenir un peu plus fonctionnelle avec une stimulation de sa biogenèse par l'intermédiaire de PGC1 α . Akt active dans ce cas mTOR qui va stimuler les OXPHOS. La quatrième vague se caractérise par le retour d'une mitochondrie complètement fonctionnelle. Il faut garder à l'esprit que ce schéma reste une hypothèse simpliste, et que la réalité est bien plus complexe. Le message principal reste toutefois que le profil métabolique d'une tumeur évolue au cours de sa progression, selon l'activation d'oncogène et l'inactivation de suppresseurs de tumeurs, mais aussi en fonction des fluctuations de l'environnement et de l'apport en nutriments.

3. Driver et passenger genes

Il existe deux types de gènes mis en cause dans les cancers: les gènes conducteurs (driver genes) et les gènes passagers (passenger genes). Les drivers genes procurent un avantage de croissance aux cellules tumorales (mutation IDH...) (Bozic et al., 2010). Il existe environ 140 drivers genes et les tumeurs peuvent contenir entre 2 et 8 de ces gènes

(Vogelstein et al., 2013). Les passagers genes n'interviennent pas dans le processus néoplasique. Ce sont des mutations qui étaient déjà présentes avant que la cellule ne devienne cancéreuse et sont souvent situées dans des régions non codantes. Les mutations des passagers genes dépendent du tissu et de l'âge du patient. En effet, il existe moins de mutations dans les cancers pédiatriques que chez les adultes. De plus, les mutations de ces gènes sont moins nombreuses dans des tissus qui ne se répliquent pas. Par exemple, il y a moins de mutation dans les glioblastomes et le cancer du pancréas que dans le cancer colorectal où les cellules épithéliales du colon se multiplient. Des mutations dans les passagers genes aboutissent un processus métastatique (Vogelstein et al., 2013). La majorité des drivers genes ont un effet sur le métabolisme énergétique (akt1 bcl2, BRAF, p16, DNMT, HNF1A, RAS, IDH1/2, PTEN, SMAD, p53...) (Vogelstein et al., 2013) de même que pour certains passagers genes (ENO1/2 (Muller et al., 2012) , ATP11A, ATP13A1, ATP13A5 dans le cancer colorectal et ATP8B1, KEAP1 dans le cancer du sein (Wood et al., 2007))

4. Microenvironnement tumoral

Les cellules cancéreuses dépendent de mutations somatiques mais également du microenvironnement tumoral. Selon Pierre Sonveaux, les cellules cancéreuses fonctionnent en symbiose en communiquant entre elles sur le plan du métabolisme énergétique. Les cellules cancéreuses peuvent également communiquer avec les cellules non cancéreuses du microenvironnement. Le microenvironnement est complexe et dynamique, tissu-spécifique, composé de cellules endothéliales, de cellules immunitaires et de fibroblastes modifiés associés au cancer (CAFs). Ces cellules sont dans la matrice extracellulaire (MEC), qui est un élément déterminant du microenvironnement. C'est en interagissant avec les composants de la MEC que la cellule peut s'ancrer à une localisation particulière ou au contraire, migrer et se déplacer. En condition physiologique, le microenvironnement joue un rôle de suppresseur de tumeur. Cependant les cellules cancéreuses vont modifier ce microenvironnement pour le rendre plus propice à la survie et à la croissance tumorale. En fonction de leur localisation au sein d'une tumeur solide, les cellules cancéreuses ne reçoivent pas toutes le même apport en oxygène, et en nutriments. La tumeur, elle même, ne reçoit pas non plus le même apport en oxygène et en nutriments car la néovascularisation de la tumeur est fragile et anarchique. Certaines tumeurs ne sont pas vascularisées et doivent survivre notamment en hypoxie et s'adapter en fonction des nutriments (acides aminés, acides gras, lactate, corps cétoniques...) qui lui sont fournis par le microenvironnement tumoral. L'équipe de Michael Lisanti propose

une nouvelle hypothèse de couplage métabolique: les cellules stromales fourniraient les nutriments nécessaires à la croissance tumorale en s'autodigérant sous l'influence des cellules cancéreuses. Lisanti et al, suggèrent que l'effet Warburg a lieu non pas dans les cellules cancéreuses, mais dans les cellules du stroma, selon un « effet Warburg inverse ». Une mutation empêche la synthèse de la cavéoline 1. L'absence de cette protéine est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer du sein ou de cancer de la prostate. D'après les analyses réalisées sur des souris KO pour la cavéoline, l'absence de la cavéoline 1 activerait la production de métabolites, tel l'ADMA (diméthylarginine asymétrique), qui entraînerait un stress oxydatif. Les cellules cancéreuses induiraient aussi directement un stress oxydatif dans les cellules stromales voisines, dont une des conséquences serait la perte de cavéoline. Le stress oxydatif endommagerait les mitochondries, poussant les cellules stromales à les dégrader (mitophagie). Cette digestion serait facilitée par HIF1 α . Privées de mitochondries, les cellules stromales seraient contraintes d'utiliser la glycolyse pour produire l'énergie vitale (effet Warburg inverse). Finalement, les produits de l'autophagie des cellules stromales et de la glycolyse (corps cétonique, lactate, acides aminés...) seraient réutilisés par les cellules cancéreuses adjacentes pour produire leur énergie, par phosphorylation oxydative (Pavlidis et al., 2012). Ces auteurs ont démontré que lorsque des cellules de cancer du sein (MCF7) étaient co-cultivées en présence des CAFs, on observe une surexpression du transporteur du lactate MCT4 sur les CAFs, permettant ainsi un export du lactate hors de la cellule. Parallèlement, une surexpression d'un autre transporteur du lactate MCT1 dans les cellules cancéreuses MCF7 est observée. MCT1 permet l'entrée du lactate dans la cellule. Lorsque les MCF7 et les CAFs sont cultivées séparément, il n'y a pas de surexpression des transporteurs du lactate (Whitaker-Menezes et al., 2011). De même, dans une autre étude du groupe de Lisanti, une surexpression des enzymes permettant la production de corps cétoniques par les CAFs associée à une surexpression des enzymes utilisant les corps cétoniques dans des cellules de cancer du sein (MDA-MB-231) entraîne une augmentation de la croissance tumorale et métastatique (Martinez-Outschoorn et al., 2012b). Ces travaux montrent un dialogue existant entre les cellules cancéreuses et son microenvironnement qui exerce un effet important dans la prolifération du cancer, faisant ainsi du stroma une cible thérapeutique intéressante. Cet aspect est discuté dans la troisième partie de cette thèse. De même Valencia et al. ont montré que dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer de la prostate, p62 (marqueur de l'autophagie) est absent dans les CAFs tandis qu'il est surexprimé dans les cellules cancéreuses adjacentes. Cette perte de p62 réprime c-Myc et mTOR et

augmentent le catabolisme et le taux de ROS ce qui favorise la tumorigenèse des cellules épithéliale du cancer de la prostate (Valencia et al., 2014).

Les cellules cancéreuses dépendent également de leur apport en oxygène. Le taux de consommation d'oxygène dépend du contenu artériel en oxygène (environ 0.2 mlO₂/ml de sang dans les tissus sains) et du flux sanguin. De nombreuses études montrent une meilleure consommation d'oxygène par les cellules cancéreuses lorsque le flux sanguin est augmenté (Vaupel and Mayer, 2012). La consommation d'oxygène par la tumeur dépend également de sa taille: Peter Vaupel a montré que sur des xénogreffes de cancer du sein, plus la taille de la tumeur est grande, plus la consommation d'oxygène diminue puisque le flux sanguin diminue également (P. Vaupel et al. 1987). La consommation d'oxygène est aussi dépendante du tissu. Le cœur consomme plus d'oxygène que le foie (100 µl/g/min contre 50µl/g/min). L'oxygénation de la tumeur va donc dépendre également du tissu qu'elle envahie. La PO₂ moyenne des tissus sains varie de 24 à 66mmHg alors qu'elle est inférieure pour à 20 mmHg pour les tissus cancéreux comme dans un cancer du sein où elle est égale à 17 mmHg. (Vaupel et al., 1989).

Une étude effectuée sur des tumeurs générées *in vitro* par la culture 3D (modèle de sphéroïdes) a mesuré divers paramètres comme le taux d'oxygène, de glucose, d'ATP, ou d'apoptose, depuis le centre de la "tumeur" jusqu'à la périphérie (Hirschhaeuser et al., 2010a, 2010b). Il apparaît un gradient en ces divers éléments, mais avec des différences. De manière intéressante, alors que le glucose vient à manquer rapidement de la périphérie vers l'intérieur, l'oxygène reste disponible plus longtemps. Cela indique que les cellules à l'intérieur de la "tumeur" peuvent utiliser les OXPHOS à partir de substrats alternatifs, alors que la glycolyse serait inopérante par le manque de glucose. Le fonctionnement des OXPHOS est rendu possible par le Km très faible du complexe IV de la chaîne respiratoire pour l'oxygène, autour de 10µM. Cette condition d'aglycémie est étudié dans la partie 2 de la thèse.

VI. Thérapies bioénergétique du cancer

1. Catalogue des approches considérées

Il existe trois types de traitements anticancéreux: la chirurgie, la radiothérapie et les traitements chimiothérapeutiques. Ces traitements sont souvent associés. Dans le cadre de cette thèse nous allons nous intéresser à la chimiothérapie. A la différence de la

chimiothérapie classique, le concept des thérapies ciblées repose sur la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogenèse et la présence de biomarqueurs associés. Le développement de thérapies ciblées permet de bloquer une ou plusieurs protéines dans la cellule cancéreuse, visant à stopper la prolifération soit en stimulant l'apoptose soit en inhibant la croissance cellulaire. D'une manière générale, ces thérapeutiques reposent sur 3 stratégies :

- ❖ Bloquer les ligands des récepteurs membranaires: le VEGF est la cible du Bevacizumab, qui l'empêche de se fixer sur son récepteur. L'angiogenèse tumorale est alors inhibée (Poulsen et al., 2014).
- ❖ Bloquer les récepteurs membranaires: le récepteur membranaire HER2 (aussi appelé Erb-B2) est la cible du trastuzumab (Herceptin) ou du lapatinib (Tyverb/Tykerb®), qui l'empêche d'activer son partenaire. Le signal mitogène médié par la surexpression de HER2 (dans 20% des cancers du sein) est inhibé (Schroeder et al., 2014).
- ❖ Empêcher l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase: le RTK est la cible d'une molécule qui va se fixer dans le site d'arrimage de l'ATP. L'ATP est un donneur de phosphate, la kinase en a besoin pour s'activer. Ceci est permis par le sorafénib, le sunitinib, et d'autres produits de la même classe (Abdel-Rahman and Fouad, 2014) comme le Gécitinib (Iressa®) ou l'erlotinib (Tarceva®) qui est un inhibiteur sélectif de la tyrosine kinase du récepteur à l'EGF (EGFR).

Plutôt que de cibler uniquement des protéines dont les gènes sont mutés spécifiquement, de nouvelles thérapies ciblant le métabolisme ont vu le jour.

2. Recherche de nouvelles cibles par l'étude du remodelage

Partant du principe que seule la glycolyse est activée dans des cancers (Effet Warburg, Cf. Chapitre IV.2), la détection de cancer en imagerie s'est inspirée de l'effet Warburg en permettant de suivre l'incorporation de glucose dans l'organisme par la tomographie à émission de positrons (TEP) à l'aide du substrat Fluoro-déoxyglucose marqué au Fluor 18 (18F-FDG), analogue non-métabolisable du glucose. Les premières études précliniques se sont focalisées sur l'inhibition de la glycolyse et des transporteurs du glucose (Cf. Tableau 1).

Le WZB117 est un inhibiteur de GLUT1 qui a montré des résultats prometteurs *in vitro* sur des lignées de cancer pulmonaire (A549) ainsi que sur des modèles animaux. Toutefois, le WZB117 induit une hyperglycémie et une perte de poids importante (Liu et al., 2012). De nombreux composés ciblant l'hexokinase ont été étudiés comme le 2-deoxyglucose (analogue non métabolisable du glucose), le lonidamine ou le 3-bromopyruvate (Cf. Tableau 1). PKM2 est un régulateur important de la glycolyse dans les cancers. Cette isoforme étant spécifique de nombreux cancers, elle apparaît comme une cible thérapeutique intéressante. Le TNL-232 est un inhibiteur spécifique de la PKM2 car il réduit la prolifération cellulaire entre 50 et 95% sur 20 lignées cellulaires différentes. Des études ont été menées *in vivo* et montrent une réduction de taille des tumeurs de 80% dans le cancer du sein et de 60% dans le cancer de la prostate (Rozei et al., 1996). Cette molécule est en essai clinique sur des mélanomes – essai en phase II (Kéri et al., 2005). Il existe également des thérapies contre les LDH. Notamment, le gossypol qui est en phase clinique II sur des glioblastome multiformes (NCT00540722), le cancer du poumon à petites cellules (Baggstrom et al., 2012) et le cancer de la prostate (Liu et al., 2009). Le FX-11 est un dérivé du gossypol avec une affinité plus grande pour la LDHA qui réduit la progression tumorale dans des xénogreffes humaines de cancer de la prostate et des leucémies (Le et al., 2010). Le clotrimazole réduit l'activité d'enzymes majeures de la glycolyse comme l'hexokinase, la phosphofructokinase-1 et la pyruvate kinase. Ce traitement est efficace dans des lignées de cancer du sein (Furtado et al., 2012). De nouvelles thérapies visent la symbiose métabolique. AZD3965 est un inhibiteur d'un transporteur du lactate MTC1 qui est en phase clinique I/II sur des tumeurs solides. Parallèlement des stratégies sont développées pour inhiber l'autre transporteur du lactate dans le cadre de cette symbiose le MCT4. Cependant aucune molécule inhibitrice efficace n'a été trouvée pour le moment (Dhup et al., 2012a).

Il faut aussi indiquer dans ce paragraphe sur les thérapies métaboliques que certains traitements ont montré leur efficacité *in vitro* sur des cellules cultivées dans un milieu de culture riche en glucose. Cette stratégie de ne cibler que la glycolyse ou les transporteurs du glucose s'est avérée limitée *in vivo* à cause de la remise en cause de l'exclusivité de l'hypothèse Warburg. Des recherches sur des traitements ciblant d'autres cibles métaboliques ont été menées ces dix dernières années. L'inhibiteur le plus connu de la PDK est la dichloroacetate (DCA). Le DCA cible les quatre isoformes de la PDK ce qui permet une activation de la PDH permettant la transformation du pyruvate en acetyl-CoA. Le DCA permet donc d'augmenter le flux de pyruvate entrant dans le cycle de Krebs et augmente le

taux de ROS qui conduirait à l'apoptose. L'effet anti-cancéreux du DCA a été montré dans différents cancers comme les glioblastomes, l'ovaire ou le poumon (Bonnet et al., 2007). Son effet est actuellement évalué en phase clinique I/II sur des cancers du sein et des glioblastomes multiformes. La mutation de l'IDH1/2 entraîne la formation d'un oncométabolite, le 2-hydroxyglutarate (Cf. Chapitre IV.8). Le ML309 est un inhibiteur spécifique de l'IDH muté qui inhibe la formation de 2-hydroxyglutarate dans les cellules de glioblastome mutée au niveau de l'IDH (Davis et al., 2014). Un autre inhibiteur, le AG-221, spécifique de l'IDH2 muté est en test en phase I/II sur des patients atteints de leucémies myéloïdes mutées pour IDH2 (Cf. Tableau 1). Une autre étude menée sur des lignées de leucémies myéloïdes mutées pour IDH1/2 montrent une réduction de la croissance tumorale avec BPTES qui est un inhibiteur de la glutaminase (Emadi et al., 2014). Le métabolisme de la glutamine est également une cible importante puisque de nombreux cancers sont sensibles à une privation en glutamine (Wise and Thompson, 2011). Un analogue de la glutamine non métabolisable, le LON, est actuellement en phase clinique I/II tout comme le phenylacétate qui réduit les taux plasmatiques de glutamine (test clinique phase II sur des tumeurs cérébrales (NCT00003241, (Thompson et al., 2003)). Des études ont montré une augmentation de l'import de glutamine dans la cellule (Fuchs and Bode, 2005). Un transporteur de la glutamine le SLC1A5 (ou ASTC2), en plus d'être un cible directe de c-myc, est surexprimé dans de nombreux cancer (sein, colon, prostate ,foie...). Le L- γ -glutamyl-p-nitroanilide (GPNA) est un inhibiteur de SLC1A5 qui empêche l'entrée de la glutamine et inhibe l'activation de mTOR qui est glutamine-dépendante (Esslinger et al., 2005). mTOR est activé par une privation en acides aminés comme la glutamine. Si mTOR reste actif, il stimule la synthèse protéique essentielle à la croissance tumorale. De plus la glutamine entraîne la phosphorylation de la S6K, qui est une cible de mTOR. L'inhibition de mTOR est donc importante dans la réussite du traitement (Nicklin et al., 2009). D'autres composés ont été testés afin de cibler les voies de signalisation régulant le métabolisme énergétique. Des inhibiteurs de mTOR ont été mis au point comme le Temsirolimus et l'Everolimus qui sont des traitements ayant passés tous les essais cliniques avec succès pour traiter les cancers du rein (Kwitkowski et al., 2010; Vogelzang et al., 2013).

| Drogue | Cible | Cancer | Phase clinique | référence |
|-----------------------------------|---------------|--|-----------------------|--|
| 2-deoxyglucose | Hexokinase | Prostate, poumon, sein, pancréas, tête et cou, gastrique | Phase I/II | NCT00633087 NCT00096707 |
| 3-Bromopyruvate | Hexokinase II | Pancréas, poumon | Préclinique | (Chapiro et al., 2014) |
| Lonidamine | Hexokinase | Prostate | Phase III | NCT00435448 NCT00237536 |
| TLN-232 | PKM2 | Mélanome | Phase II | NCT00735332 |
| AT-101 (gossypol) | LDHA/B | Poumon, Glioblastome multiforme | Phase I/II | NCT00544596 NCT00540722 |
| FX-11 | LDHA/B | Prostate, leucémie | Préclinique | (Le et al., 2010) |
| AZD3965 | MCT1 | Prostate, lymphome, gastrique | Phase I/II | NCT01791595 |
| DCA | PDK | Sein, glioblastome multiforme | Phase I/II | NCT00540176 NCT00566410 NCT00703859 |
| ML309 | IDH1/2 muté | Glioblastome | Préclinique | (Davis et al., 2014) |
| AG-221 | IDH2 muté | Leucémie myéloïde, lymphome | Phase I | NCT01915498 NCT02273739 |
| phenylacetate | Glutamine | Cerveau | Phase I/II | NCT00003241 NCT00006450 NCT00001565 |
| L-DON | Glutamine | Tumeurs solides | Phase I/II | NCT02263950 |
| BPTES | Glutaminase | Lymphome | préclinique | (Shukla et al., 2012) (Emadi et al., 2014) |
| Temsirolimus et Everolimus | mTORC1 | Rein | Approuvé | NDA203985 (Shukla et al., |

| | | | | |
|----------------------|--------|---|------------|--|
| | | | | 2012) |
| Ridaforolimus | mTORC1 | Prostate | Phase I/II | NCT00110188 |
| Metformin | AMPK | Lymphome, sein, endomètre, rein, poumon | Phase I/II | NCT00659568 NCT00881725 NCT00984490 NCT00909506 |

Tableau 1 : Liste des traitements ciblant le métabolisme énergétique en cours de test clinique

Des traitements anticancéreux en cours d'évaluation sur les tumeurs entraînent une reprogrammation métabolique. Nous pouvons citer ici la metformine. L'efficacité de la metformine a été d'abord démontrée chez des patients diabétiques de type II. 214 études cliniques (<http://clinicaltrials.gov>) impliquant la metformine ont été menées dans différents cancers (sein, poumon, colon, tête et cou, leucémie....). Cependant le mécanisme d'action de la metformine est encore mal connu. Dans des leucémies, le groupe de JE Sarry a montré que la metformine entraîne une activation de l'AMPK avec une diminution de l'activité du complexe I, de la consommation d'oxygène et de la synthèse d'ATP mitochondrial. Ceci s'accompagne d'une stimulation de la glycolyse (qui produit l'ATP), de la production de lactate et de la voie des PPP. Cependant les cellules leucémiques sont soumises à un effet Pasteur (limitation du flux dans la glycolyse via le citrate et l'ATP mitochondrial). La metformine n'est efficace que dans les cellules leucémiques qui répondent à cette drogue avec un fort effet pasteur (Scotland et al., 2013).

Des traitements ciblant les métastases ont également vu le jour. L'équipe de Pierre Sonveaux montre qu'un cycle de Krebs aberrant avec une production de ROS entraînent une dissémination métastatique. La production de ROS est lié à une augmentation de l'activité des complexes de la chaînes respiratoire ou à l'inverse à une inhibition partielle des complexes. Si on cible pharmacologiquement les mtROS avec mitoTEMPO cela empêche la dissémination métastatique sur des tumeurs primaires murins et humains (Porporato et al., 2014a).

3. Stratégies de combinaisons de drogues

Dans certains cas le métabolisme du glucose et de la glutamine sont sollicités comme dans le cas du mélanome. Ces deux voies métaboliques se compensent l'une et l'autre, suggérant l'utilisation d'une combinaison de drogues afin de cibler les deux voies. Une étude pré-clinique menée sur des mélanomes mutés BFRFV600E, par l'équipe de Jérôme Kluza, combine le DCA (inhibiteur de la PDK) avec l'elesclomol qui est pro-oxydant. La combinaison des deux composés entraîne une diminution de la viabilité cellulaire plus grande par rapport à chaque traitement séparé. De même sur des xénogreffes HBL il existe une meilleure réduction de la prolifération et une meilleure induction à l'apoptose quand les deux composés sont combinés (Kluza et al., 2012). Certains traitements contre des mutations spécifiques sont tissus-dépendant. En effet, le Vemurafenib est un traitement dans les mélanomes mutés pour BRAFV600E qui montrent une forte réminiscence (84% de survie à 6 mois) (Haanen et al., 2011). Cependant le Vemurafenib ne fonctionne pas dans le cancer colorectal même si les cellules sont porteuses de la même mutation BRAFV600E. Ceci est dû à l'expression concomitante d'une mutation de l'EGFR qui active la voie PI3K/Akt et contrebalance l'effet des inhibiteurs de BRAF entraînant une résistance au traitement (Mao et al., 2013). La recrudescence des résistances aux traitements est due, entre autre, à l'hétérogénéité intratumorale et à la reprogrammation métabolique. Au sein d'une même tumeur, il existe différentes mutations qui peuvent induire une résistance au traitement comme les mutations BRAFV600E et l'EGFR dans les cancers colorectaux. C'est pour cela que les patients sont souvent traités avec une combinaison de deux ou plusieurs drogues. La probabilité que les tumeurs soient résistantes à deux drogues qui ciblent deux voies indépendantes est moins importante que la probabilité de résistance à un seul agent. Par exemple, une combinaison entre le dabrafenib (inhibiteur de BRAF) et du trametinib (inhibiteur de MEK) dans des mélanomes mutés BRAF, montrent une amélioration du taux de réponse globale par rapport au dabrafenib seul (Flaherty et al., 2012). La combinaison du WZB117 (inhibiteur de GLUT1) et du 5-Fluorouracil (traitement classique du cancer du colon) dans le cancer du colon, entraîne une augmentation significative de la sensibilité au 5-Fluorouracil dans des cellules qui étaient résistantes à cette drogue car la résistance au 5-Fluorouracil est due à une augmentation de l'expression de GLUT1 (Liu et al., 2014). Dans un autre exemple, Faber et al., ont criblé 130 composés sur une collection de 600 lignées cellulaires cancéreuses. Ils ont montré que les cellules de cancer colorectal mutées KRAS étaient sensibles à la co-inhibition de BCL2, BCL-XL et MCL-1. Le seul composé qui inhibe les trois cibles est l'obatoclax, mais il possède une toxicité clinique qui limite son exploitation. Ces auteurs essaient donc de recréer cette co-inhibition par combinaison de molécules.

mTORC1 est connu pour inhiber MCL-1. L'équipe a donc eu l'idée de combiner l'AZD8055 (inhibiteur de mTORC1 donc de MCL-1) avec le ABT-263 qui inhibe BCL-2/BCL-XL. La combinaison des deux composés entraîne une régression des tumeurs sur un modèle murins de xénogreffes du cancer colorectal muté KRAS dans un modèle GEMM (genetically engineered mouse models) (Faber et al., 2014). Parfois, des traitements ayant un résultat en phase pré-clinique décevant peuvent avoir un effet important en combinaison avec d'autres composés. Le 2-désoxy-glucose, un inhibiteur de la glycolyse avait des résultats *in vitro* très prometteurs. Seulement les doses de 2DG permettant de tuer les cellules cancéreuses ne correspondent pas à des doses physiologiques respectables entraînant une forte toxicité (Kaplan et al., 1990). Cependant une association du 2DG avec d'autres traitements comme le trastuzumab a montré un effet important dans les cancers du sein résistant au trastuzumab (Zhao et al., 2011) .

4. Limitations actuelles

L'hétérogénéité inter-patient et intra-tumorale sont des problèmes majeurs, de même que l'évolution du profil métabolique au cours de la tumorigenèse. Par exemple, un cancer du poumon peut être déclenché par différentes mutations (mutation de EGFR, KRAS, NF1, BRAF...). Le traitement sera donc différent en fonction de la mutation majeure du cancer présente dans les différents patients qui possèdent un profil génétique et donc des mutations qui leur sont propres. Les thérapies individuelles en fonction du génome du patient reposent sur l'appréciation de cette hétérogénéité et sont de plus en plus envisagées (Vogelstein et al., 2013). TRAP1 est une protéine chaperonne située dans la mitochondrie. Elle est surexprimée dans certains cancers comme le cancer colorectal, du sein, de la vessie.... (Rasola et al., 2014). Des inhibiteurs de TRAP1 ont démontré une activité anticancéreuse dans des essais précliniques. Cependant, une équipe de Genève a découvert que TRAP1 régule un "interrupteur" métabolique au niveau de la glycolyse. Lorsque cette protéine est surexprimée, les cellules favorisent la glycolyse pour produire l'énergie car TRAP1 inhibe la succinate déshydrogénase (Complexe II) (Sciacovelli et al., 2013). En revanche, lors d'un stade tumoral plus avancé, TRAP1 diminue fortement et les cellules utilisent donc la mitochondrie pour produire l'ATP nécessaire à la formation de métastases. Les stratégies anticancéreuses ciblant cette protéine pourraient donc avoir des effets pervers sur les tumeurs capables de favoriser une voie métabolique ou l'autre, selon leurs besoins. Tout en inhibant la prolifération cellulaire, ce type de traitement pourrait en fait stimuler la progression vers un stade métastatique (Yoshida et al., 2013). De plus il existe un problème d'hétérogénéité interne dans

le cancer. Au sein d'une même tumeur, les cellules peuvent présenter un profil métabolique différent (comme expliqué dans la théorie symbiotique du Pr. Sonveaux) ainsi que des mutations différentes. Les traitements dirigés contre une cible permettent de tuer les cellules possédant cette cible mais au sein d'une même tumeur d'autres cellules cancéreuses ne sont pas porteuses de cette cible (Vogelstein et al., 2013). Le même problème d'hétérogénéité se pose au niveau des métastases pour un même patient. De même, au sein d'une même tumeur, il peuvent exister différentes mutations de RAS dans une tumeur (Russo et al., 2014). Faut-il générer des traitements qui ciblent en priorité les protéines dont les gènes sont mutés ou alors des protéines dérégulées intervenant dans le métabolisme énergétique?

QUESTION BIOLOGIQUE DE
LA THÈSE

La question biologique qui a motivé cette thèse est la suivante : **comment s'effectuent les remaniements cellulaires étendus du métabolisme et comment s'opère la coordination entre les différentes voies métaboliques impliqués lors de telles transformations ?**

Cette question émane d'observations en biologie, où la cellule se transforme sur le plan bioénergétique pour réaliser la différenciation cellulaire ou pour s'adapter à des contraintes du milieu, ou encore à une altération génétique ou même à une drogue.

Le laboratoire avait introduit le terme de "mitoplasticité", car ses membres ont observé un remodelage physique et compositionnel de la mitochondrie dans les maladies mitochondriales ou en réponse à des inhibiteurs de la chaîne respiratoire.

Les cellules cancéreuses dotées d'une capacité adaptative redoutable sont un formidable terrain de jeu pour étudier la plasticité du métabolisme. Le premier grand remodelage métabolique décrit fut l'effet Warburg, et ses bases ne sont toujours pas complètement élucidées. Les changements associés à la naissance et à la vie aérienne furent aussi bien décrits. Le nombre de protéines intervenant dans cet effet Warburg est impressionnant et il ne s'agit là que d'un seul type de remodelage. Des données récentes ont montré des remaniements au niveau du cycle de Krebs, de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphates etc.

La question posée dans cette thèse se voulait large et non ciblée sur une voie, mais plutôt sur des transformations : la transformation induite par l'activation oncogénique de HRAS, la transformation induite par la privation en glucose, et la transformation d'un tissu sain en un tissu cancéreux au sein de l'organisme. La confrontation de ces trois modèles devrait nous permettre de dégager des traits communs, des mécanismes conservés, qui pourront nous aider à mieux comprendre le phénomène du remodelage métabolique de manière intégrative.

Cette question des bases moléculaires et de l'intégration du remodelage métabolique ne peut être approchée qu'à l'aide de méthodes de type « omique », et nous avons choisi la protéomique pour sa proximité avec la fonction des enzymes, plutôt que la transcriptomique.

Sur trois modèles d'études, nous avons réalisé de nombreuses expériences destinées à caractériser le remodelage et les mécanismes moléculaires au niveau biochimique et génétique.

Cette question biologique des déterminants du remodelage métabolique est liée à la mise en œuvre de stratégies anticancéreuses basées sur la découverte de vulnérabilités métaboliques du cancer. L'étude des mécanismes du remodelage avait donc aussi pour objectif d'identifier des biomarqueurs témoignant de différents types de remodelage et des cibles thérapeutiques

ARTICLE DE REVUE

Emerging Concepts in Bioenergetics and Cancer research: Metabolic Flexibility, Coupling, Symbiosis, Switch, Remodeling, Signaling and Therapy.

Emilie OBRE and Rodrigue ROSSIGNOL

Laboratory "MRGM" Rare Diseases : Genetics and Metabolism

University of Bordeaux, Bordeaux (France)

Running title: Metabolic remodeling

KEYWORDS: Mitochondria / Bioenergetics / Oxidative phosphorylation/ Cancer / Metabolic flexibility / Oncobioenergetics

Corresponding author: Dr. Rodrigue ROSSIGNOL, EA4576 MRGM, université de Bordeaux, CHU Pellegrin, Place Amélie Raba-Léon, Ecole des Sages Femmes, étage 2. Phone: +33557821054 Email: rossig@u-bordeaux2.fr

Abstract : Human tissues differ by the type and the amount of energy substrate that they use and store, as dictated by their genetically programmed ‘metabolic rigidity’ which defines the expression of tissue-specific catabolic and anabolic enzymes. For instance, adipocytes and neurons cannot perform fat oxidation, while cardiomyocytes utilize mainly fatty acids for ATP synthesis. These programs evolve during embryogenesis, with a typical burst of oxidative metabolism at birth. Bioenergetic homeostasis is regulated at the cellular level by effectors such as insulin, and at the organismal level by the metabolic coupling between ‘energy donor’ tissues, as the adipose tissue and the liver, and ‘receivers’ as the muscle and the brain. In contrast to normal tissues, most tumors develop a dramatic ‘metabolic flexibility’, which allows them to consume whatever energy substrate is available. Yet, recent findings suggest that metabolic flexibility is restricted by specific anabolic needs, so that alternative energy transducing pathways are not selected randomly. Cancer cells also avoid the metabolic control by insulin, growth factors and energy substrate starvation or excess by typical mutations in the MAPK, PI3K, RAS and related pathways. Metabolic flexibility is made possible by the molecular rewiring of several metabolic pathways, which undergo branching, truncation and reversal, as extensively documented for the Krebs cycle in the last decade. Alike normal tissues, tumors can take advantage of metabolic coupling with other tissues, although this phenomenon remains poorly described. A related bioenergetic peculiarity of cancer cells concerns the metabolic coupling which occurs inside the tumors, between hypoxic-glycolytic and oxygenated-oxidative cancer cells. Undoubtedly, the fundamental studies on metabolic rigidity in normal tissues and on metabolic flexibility in cancer cells have revealed novel means of bioenergetic control, such as the essential signaling activity of the oncometabolites succinate, fumarate, oxoglutarate or acetyl-coA on HIF1 α and NRF2 transcription factors, but also histone acetylases, respectively. The well-known regulation of OXPHOS by citrate, NADH, F1,6bP, Ca²⁺ and ATP on glycolytic enzymes, IDH, PDH and CIV also operates in cancer cells. Besides energy homeostasis, the study of cancer cell metabolic remodeling has shed light on the close links between the modalities of energy transduction and the capacity to synthesize amino-acids or lipids necessary for tumor growth. Metabolic remodeling is not restricted to cancer and has been investigated in genetically inherited metabolic disorders as mitochondrial diseases, or in the multifactorial metabolic syndrome. The results demonstrated the existence of alternative pathways of ATP synthesis and the effect of oxidative stress on TCA truncation via aconitase cleavage for instance. Nowadays, large-scale analyses of comprehensive proteomics, transcriptomics and metabolomics, potentially supported by computer modeling of metabolism and genetic approaches of sub-pathways validation, allow the deciphering of the fine changes in cell metabolism, both in physiology and pathology. Patterns of metabolic deviations and the corresponding genetic signatures can be confirmed by flux analyses using ¹³C-labeled isotopes of relevant metabolites. Analysis of deviant metabolism can identify potential targets so that therapeutic strategies could be derived from this knowledge, and ongoing preclinical studies aim to alter the alternative metabolic pathways in cancer.

1) Energy metabolism, control and regulation

The basic principles of energy metabolism regulation were deciphered in the late 50's with the work of Warburg, Lenhinger, Krebs, Chance, Petersen, Weinhouse, and Vaupel among several others (1, 2). The regulation of controlling enzymes belonging to glycolysis, PDH complex and Krebs cycle, all involved in ATP synthesis mostly occurs by metabolic intermediates as ATP itself, citrate, F1,6bP, and Pi. Another level of regulation of mitochondrial energy fluxes, as ATP synthesis or respiration was identified by Chance and Williams in the 50's with the so-called 'respiratory control' by ADP (4, 5). Thereafter, a large number of additional molecular regulations of oxidative phosphorylation (OXPHOS) were identified, as the recently discovered OPA1 dependent-stabilization of the respiratory supercomplexes (5), the ATP-synthase dependent assembly of complex III (6) and the energy-state dependent RHEB-induced control of mitochondrial turnover (7). Consideration of the numerous means to regulate ATP transduction in the cell led to the notion of a « multi-step control » of energy metabolism (8). More recently, the regulation of energy metabolism was closely linked, in a mutual way, with the control of cell growth and division. For instance, a signaling pathway central to cell biology and governed by the HIF1 α transcription factor, was shown to mediate a shift in a subunit of respiratory chain complex IV (9). Conversely, succinate accumulation in the cytosol is capable of inhibiting HIF1 α degradation and to promote its stabilization (10). Likewise, the AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway stimulates the expression of several OXPHOS proteins when ATP needs are increased, as initiated by a higher ADP/ATP ratio in the cytosol (11). Another central pathway is the control of energy metabolism is the PGC1 α pathway, a transcription co-activator, which participates in the stimulation of oxidative phosphorylation in cooperation with ERR- α , or to the induction of gluconeogenesis in cooperation with HNF4 α (12). The RAS protein, involved in the control of cell mitogenic activities, also controls oxidative phosphorylation, both in cancer and non-cancer tissues (13–16). A role in modulation of OXPHOS capacity was also discovered for MYC and for p53, both of which play central roles in the control of cell growth and division, leading to the emerging concept of oncobioenergetics (17). Central to this review article, a new layer of upper- or meta-regulation of energy metabolism was identified with the discovery of rewiring of metabolic circuits, governed by genetic determinants connected or not with changes in cell microenvironment. In particular, this upper level of bioenergetic control links catabolism with anabolism, thereby providing a more integrated view of cell metabolism plasticity. Prior to discussing the molecular bases and the physiology of metabolic remodeling, we provide below a rapid overview on cellular bioenergetics.

In most human tissues, mitochondria provide the energy necessary for cell growth, and biological activities. It has been estimated that about 90 % of mammalian oxygen consumption is mitochondrial, which primarily serves to synthesize ATP, although in variable levels according to the tissue considered and the organism's activity status. Mitochondria intervene in the ultimate phase of cellular catabolism, following the enzymatic reactions of intermediate metabolism that degrade carbohydrates, fats and proteins into smaller molecules such as pyruvate, fatty acids and amino acids, respectively (**Figure 1**). Mitochondria further transform these pro-energetic elements into NADH and/or FADH₂, through β -oxidation and the Krebs cycle. Those reduced equivalents are then degraded by the mitochondrial respiratory chain in a global energy converting process called oxidative phosphorylation (OXPHOS) where the electrons liberated by the oxidation of NADH and FADH₂ are passed along a series of carriers regrouped under the name of "respiratory chain" or "electron transport chain" (ETC), and ultimately transferred to molecular oxygen (**Figure 2**). ETC is located in mitochondrial inner membrane, with an enrichment in the cristae. ETC consists of four enzyme complexes (complexes I – IV), and two mobile electron carriers (coenzyme Q and cytochrome c). These complexes are composed of numerous subunits encoded by nuclear and mitochondrial genes, at the exception of complex II (nuclear only). It was demonstrated that these complexes assemble into supramolecular assemblies called "supercomplexes" or respirasome (18, 19). It is still debated whether some complexes, as complex I, can be found alone or if all are embedded in supercomplexes. In addition to the classic ETC components, other proteins are involved in the oxidation of nutrient-derived reduced equivalents and the subsequent reduction of coenzyme Q, used for ultimate ATP synthesis. This is the case for the electron-flavo-protein system, composed of the ETF_{A/B} and the ETF-QO, which connect fatty-acid oxidation with coenzyme Q reduction. The glycerol-3-phosphate dehydrogenase, which oxidizes cytosolic NADH to reduce mitochondrial FAD also supports oxidative phosphorylation and participate to REDOX homeostasis. Lastly, the NADH-shuttling system, as the malate-aspartate shuttle also fuels OXPHOS and supports REDOX homeostasis via the delivery of cytosolic NADH to the mitochondrial matrix. The oxidation of NADH or FADH₂ by complex I or complex II, respectively, triggers the transfer of electrons from complex I (or II) to complex IV and mediates the extrusion of protons from the matrix to the inter-membrane space, thus generating an electrochemical gradient of protons ($\Delta\hat{u}_H^+$) which is finally used by the F₁F₀ ATP synthase (*i.e* complex V) to produce adenosine triphosphate (ATP), the main energetic currency of the cell. This gradient has two components: an electric potential ($\Delta\Psi$) and a chemical potential ($\Delta\mu_H^+$) that can also be expressed as a pH gradient (ΔpH). According to the chemiosmotic theory proposed by Peter Mitchell in 1961 (20), $\Delta\hat{u}_H^+ = \Delta\Psi - Z\Delta\text{pH}$, with $Z = -2.303 RT/F$.

Under physiological conditions, mitochondrial energy production can alternate between two energy steady-states: basically, at state 4 (also denominated the “leak respiration state”), respiration is slow and ATP is not produced ($\Delta\Psi$ is high), while during state 3, respiration is rapid and ATP is largely produced ($\Delta\Psi$ is lower). In particular conditions, such as mitochondrial inner membrane permeabilization or the use of a chemical uncoupler, $\Delta\Psi$ can be totally dispersed. As a consequence, respiration is accelerated and ATP production annihilated. The inhibition of respiratory chain complexes also generally decreases $\Delta\Psi$. Under physiological conditions, it is considered that mitochondria produce ATP in an intermediate state lying between state 3 and state 4. As shown by E. Gnaiger, respiration strongly depends on the availability of energy substrates which are multiple and can cooperate at the level of the Q-junction, thereby determining the value of the apparent maximal (uncoupled) respiration (21). ATP is the only form of energy used by the cell, and when produced in the mitochondrion it is exported to the cytosol by the adenine nucleotide translocators (ANT1-4) in exchange for cytosolic ADP. Generally, the transport of energy metabolites, nucleotides and cofactors in and out of the mitochondrial matrix is performed by specific transporters located in the inner membrane (22). These carriers belong to the SLC25 subfamily and can consume the membrane electrochemical gradient, depending on their mechanism of transport (electroneutral or electrogenic). A large part of OXPHOS regulation occurs at the level of these carriers, as shown by the control of the glutamate-aspartate shuttle (SLC25A12 also named Aralar or AGC1) by calcium (**Figure 3**) and the “Gas-pedal” model proposed by Frank Gellerich (23). Studies of metabolic control also showed that a large part of the control of mitochondrial respiration is located at the level of substrate carriers although the cargo of several mitochondrial carriers still remains unknown (24).

Therefore, the regulation of mitochondrial energy production is concerted and multi-site (**Figure 4**). Bioenergetic control has been described at the level of the individual complexes, membrane leak, respirasome cohesion or carrier activity. One should add to this molecular description the numerous signaling pathways that modulate OXPHOS properties and activity (AMPK, HIF1 α , PGC1 α , RAS, MYC...); this has been reviewed elsewhere (25). To conclude, the different levels of OXPHOS regulation include (1) the direct modulation of respiratory chain kinetic parameters, (2) modulation of OXPHOS intrinsic efficiency by changes in the basal proton conductance or the induced proton conductance, (3) possible changes in the morphological state of the mitochondrial compartment, (4) modulation of mitochondrial biogenesis and degradation, and (5) *in situ* regulation of mitochondrial heterogeneity by the cellular and the mitochondrial microenvironment. Most of these regulatory mechanisms of mitochondrial energy transduction were discovered at the level of the respiratory chain and its surrounding lipidic environment. Below, we discuss a wider level of bioenergetic regulation (6) which considers a large-scale modification of the metabolic pathways involved in catabolism and anabolism.

2) Metabolic remodeling in physiology and metabolic disorders

The different tissues of the human organism demonstrate a preference for particular energy substrates, dictated by their enzymatic equipment, linked with their physiology. The adipocytes involved in fat storage do not contain the machinery for β -oxidation, so that fatty acids are not consumed. Likewise, the brain relies mostly on glucose and lactate, with a limited capacity to oxidize fat. Conversely, the heart favors fatty-acid oxidation for ATP synthesis, while the skeletal muscle (depending on the type of fibers) consumes glucose, glycerol, fatty-acids, ketones, and then amino-acids as valine. The liver serves for energy storage in the form of glycerol and also fat. Therefore, tissue-specific differences in the molecular organization of the metabolic pathways determine the metabolic abilities of these tissues, as well as their storage capacity, both qualitatively and quantitatively (**Figure 5**). Physiology can also adapt to variations in nutrient availability, as metabolic coupling exists between organs, as observed in conditions of fasting. In such situation, the liver can liberate ketone bodies that will be consumed by the brain. Intermediates of amino-acids degradation, as 3-hydroxybutyrate, can also be used for gluconeogenesis in different tissues under such conditions. Studies performed in the 70's revealed genetic mechanisms of metabolic control, as well as described the regulatory role of different hormones, as insulin, leptin and grehlin. Therefore, metabolic flexibility can be modulated at the level of the cell, the tissue or the whole organism by inter-related mechanisms. As discussed below, such regulatory circuits involved in the control of metabolic plasticity could serve for therapeutic intervention in situations of excess food intake or genetic disorders, as suggested for the Metabolic Syndrome but also for Cancer.

Metabolic syndrome is a multisystemic disease with a complex pathophysiology. One determinant is excess food intake that triggers increased (visceral) fat storage, insulin resistance, and metabolic alteration at the cellular level. Mitochondrial deficiency was observed in models of metabolic syndrome were a reduction of the respiratory rate and an increased production of reactive oxygen species (ROS) were reported (26). Accordingly, ROS-induced alterations of mitochondrial proteins were also described in the metabolic syndrome, as S-glutathionylations and carbonylations (26). Interestingly, proteomic studies revealed that adaptative processes occurred in different diseased tissues to counter those ROS-induced damages (27). The observed up-regulation of enzymes involved in ROS and aldehydes detoxification strengthened the hypothesis of oxidative stress in the pathophysiology of the metabolic syndrome. Murphy and colleagues recently proposed that an excess of ROS could participate in the metabolic remodeling described in tissues from patients with the metabolic syndrome (28). Such remodeling includes the cleavage of aconitase, a TCA enzyme which normally transforms citrate in isocitrate. When aconitase is cleaved (29), citrate accumulates in the

matrix and leaks out from the mitochondrion by a dedicated carrier. In the cytosol, the ATP-citrate lyase (ACLY) cleaves citrate in acetyl-coA and oxaloacetate, so that lipid synthesis can proceed from acetylcoA (30), while oxaloacetate can enter neoglucogenesis. This circuit of truncated Krebs cycle can accomodate constant overfueling of the mitochondrion by pyruvate generated from carbohydrates. The deviation of the Krebs cycle toward anabolism was also observed in some cancer cells, where truncation of the Krebs cycle allows lipid synthesis from citrate, produced either from pyruvate (metabolic syndrome) or from glutamine (cancer) (**Figure 6**).

In the case of cancer, there is no excess food intake, but a strong demand for both ATP production and various biosyntheses as lipids. The role of ACLY goes beyond lipid synthesis, as the acetyl-coA generated by this enzyme can serve for histone acetylation, and the subsequent regulation of bioenergetic genes expression, as LDHA (31). This loop of bioenergetic control evidenced in cancer was not studied in metabolic syndrome. Another example of metabolic remodeling in metabolic disorders was described in genetic mitochondrial diseases (32). The group of M.J Falk recently investigated the common downstream effects of primary respiratory chain dysfunction on global gene expression and pathway regulation. To this end, a bioinformatic analysis of transcriptome datasets from all publicly available studies of respiratory dysfunction resulting from genetic disorders, acute pathophysiologic processes, or environmental toxins was developed.

This analysis revealed the cellular and tissue adaptative response to mitochondrial dysfunction, which identified several commonly dysregulated genes across diverse mitochondrial diseases etiologies, models, and tissue types (33, 34). In particular, the so-called integrated nutrient-sensing signaling network (NSSN) centered on the AKT/mTORC pathways appeared to be one central mediator of the cellular response to respiratory chain dysfunction. NSSN includes the AMPK (low energy sensor), mTORC1 (cell growth regulator by balancing cytosolic protein synthesis and autophagy), SREBP (lipid homeostasis), *FOXO1* (glucose homeostasis), and *PPAR* family transcription factors (lipid metabolism), as well as *YY1/PGC1 α* (mitochondrial ribosome biogenesis) and *HIF1 α* (hypoxia response) transcription factors. The metabolic remodeling suggested by such transcriptomic analyses and the associated GSEA and KEGG functional analyses, revealed a modulation of the genes involved in fatty acid and amino-acid metabolism, as a central feature of metabolic remodeling in mitochondrial diseases. This type of study indicates that cells or tissues carrying an ETC defect do not simply rely of the Pasteur effect to activate glycolysis to generate ATP, but that a more profound metabolic remodeling occurs to fulfill other needs that remain to be identified, in order to propose innovative therapeutic approaches. A recent study on resveratrol showed that fibroblasts from patients carrying a complex I or a complex IV defect can be rescued at the level of respiration and ATPsynthesis by treatment with this drug (35). In this study, two types of patients were indentified as responders or non-responders. The differences between these patients are not well

understood at the molecular level, and a thorough proteomic analysis of metabolic remodeling could provide such information.

3) Molecular basis of the metabolic flexibility of tumors

At the molecular level, metabolic flexibility relies on the rewiring of existing metabolic pathways (**Figure 6**), and the synthesis/degradation of metabolic « pathway switching proteins » or « alternative pathway enhancing proteins » which allow an efficient rerouting of metabolites selected by cellular needs. A thorough investigation of the molecular and signaling mechanisms underlying cancer cells (and other metabolically diseased cells) metabolic remodeling could allow to identify « pathway switching proteins » and « alternative pathway enhancing proteins », which could be considered as innovative targets for the metabolic therapy of cancer. One strategy to alter the metabolic flexibility of cancer cells resides in the ability to block the catalytic function of PSPs or APEPs. As shown in **Figure 6**, different types of metabolic remodeling have been reported. The first observation by Otto Warburg revealed that some tumors consumed large amount of glucose without a parallel consumption of oxygen, but increased production of lactate (36). Following these seminal findings, many studies addressed the molecular basis of the Warburg effect (17). Several mechanisms were identified, as the stimulation of glycolysis by oncogenes (the so-called « high-glycolysis »), notably via the expression of rapid fetal-like isoforms. The Warburg effect also raised the hypothesis of dysfunctional mitochondria, to explain why pyruvate was not degraded by the Krebs cycle. During his Nobel Prize Lecture, at Lindau, Germany, in 1966, Otto Warburg stated that « *The prime cause of cancer is the replacement of the respiration of oxygen in normal body cells by a fermentation of sugar* ». From the early 90's until now, molecular mechanisms were discovered at the level of the mitochondrion to explain the Warburg effect, with the inhibition of PDH by PDK1 overexpression (controlled by HIF1 α), the reduction of mitochondrial biogenesis (notably triggered by p53 inactivation) or the inhibition of respiratory chain activity (also triggered by mutant p53 via SCO2 and by HIF1 α through a COX4-1/2 subunit isoform shift (9).

Yet, it is very important to mention here that not all cancer cells conform to the Warburg effect, and that some cancer cells represent an opposite phenotype, i.e., with enhancement of the OXPHOS system (**Figure 6**). As we discussed in a previous article, a large body of evidence indicates the existence of oxidative cancer cells and tumors both *in vitro* and *in vivo* (37). Already in 1976, Reitzer LJ reported that « *in HeLa cells glutamine provides more than half of the cellular energy by aerobic oxidation from citric acid cycle metabolism when glucose is present* ». Likewise, the idea that glucose, glutamine, hydroxybutyrate or palmitate can serve both for energy production and anabolism (lipid and cholesterol synthesis) was experimentally tested (38). This work demonstrated that freshly

excised Morris hepatomas can oxidize palmitate and hydroxybutyrate to produce ATP. The molecular determinants of this oxidative phenotype include the activation of mitochondrial biogenesis, the stimulation of fatty-acid oxidation, the stimulation of canonical or non-canonical glutaminolysis and the activation of amino-acid degradation pathways. The « oxidative phenotype » of cancer cells illustrated in **Figure 6** (bottom panel where ATP is produced by OXPHOS from fatty acids oxidation or glutamine oxidation) was found in lymphomas, melanomas, glioblastomas and breast cancer. Between these two extreme phenotypes, i.e., the Warburg (glycolytic) and the « oxidative », other types of metabolic remodeling were recently described. Indeed, looking at the anabolic side, studies revealed the existence of Krebs cycle truncation aiming at the conversion of glutamine to lipids, via citrate extrusion from the mitochondrion and production of acetyl-coA using the enzyme ATP-citrate lyase.

Different modes of glutamine utilization have been described and proposed (**Figure 7**), with the Krebs cycle running in the textbook direction « clockwise » or in the deviant mode « anti-clockwise » (39–43). The first mode of ‘canonic glutaminolysis’ involves glutamine entry in the mitochondrion by a carrier that remains to be discovered, then glutaminase (GLSK) and glutamine dehydrogenase (GDH) transform glutamine in alpha-keto glutarate to feed the Krebs cycle in the mitochondrion. This mode generates ATP and NH₃. Please note that different isoforms of GDH exist: GDH1 (NAD dependent) and GDH2 (NADP dependent). In the ‘Biosynthetic glutaminolysis’, malate and citrate can leak out of the Krebs cycle to feed lipid synthesis and neoglucogenesis. Alternatively, in that ‘Biosynthetic mode’, TCA cycle does not proceed in the normal direction when NADH/NAD⁺ is elevated. In that condition, oxoglutarate is converted in isocitrate (using IDH3 that do not depend on NADH but NADPH) and isocitrate can leak out of the mitochondrion to produce oxoglutarate via IDH1. In the ‘REDOX mode’ of glutaminolysis, glutamate enters the mitochondrion through AGC1 (ARALAR, SLC25A12) to import NADH via the associated entry of malate (so-called malate-aspartate shuttle). No net formation of CO₂ occurs here. In the last hypothetical mode of ‘Uncoupling glutaminolysis’, the aspartate produced from glutamate (via GOT2) is exported in the cytosol by UCP2, in exchange with Pi and a proton (Vozza et al. 2014). This will reduce the electrochemical gradient of proton generated by the respiratory chain across mitochondrial membrane.

Little is known on the metabolic remodeling that utilizes fatty-acids as carbon substrates, or amino-acids as valine, since the acetyl-coA produced by β -oxidation could serve for ketogenesis but also other means, as re-entry in the TCA. It may be pointed out here that most of the metabolic deviations were discovered during attempts to understand the link between mutations in TCA cycle enzymes such as SDH, IDH1/2 and FH, and a predisposition to tumors as diverse as hereditary paragangliomas (44), leiomyomas (10) and glioblastomas multiforme (45). The fate of branched-chain amino acids or ketone bodies is also poorly described, despite reports that indicate the use of such energy sources by different types of tumors (46). Strong advances in the field of metabolic remodeling

were presented by the group of R. DeBerardinis which investigated the fate of glucose and glutamine in different types of cancers, both *in vitro* and *in vivo*, even in human subjects (47). In 2012, this group reported that glucose oxidation by the mitochondrion is active in glioblastomas, as measured in the mouse brain *in vivo* (39). Interestingly, glucose was converted to CO₂ and glutamine. Analysis of human gliomas xenografts also showed that glutamine can regenerate glucose through neoglucogenesis, evidencing the complexity of tumor metabolic remodeling. As mentioned in the introduction, neoglucogenesis typically occurs in the liver, while here malignant brain cells are capable of doing so from glutamine. The study of brain tumors metabolism by NMR showed that ¹³C glucose is converted to lactate, glycine, glutamate and glutamine, indicating again the importance of glutamine synthesis in brain tumors (48).

4) The signaling pathways involved in metabolic remodeling

The understanding of metabolic remodeling in cancer cells and other diseases also requires the investigation of the signaling mechanisms involved in pathways switching. So far, many determinants have been found to explain the Warburg-type of metabolic remodeling, with well-described roles for HIF1 α , MYC, p53, PTEN, PI3K, Akt, LKB1 and AMPK on most glycolytic enzymes and LDH. At the level of the mitochondrion, PDH inhibition depends on HIF1 α , glutaminolysis is activated by MYC, as well as lipid synthesis from citrate (at the level of ACLY). A general negative-regulator of the Warburg effect is AMPK, in agreement with the frequent alteration of the LKB1-AMPK axis in cancer cells (49). So far, no cancer-related dysregulation has been discovered at the level of the newly identified pyruvate carrier (50), which could participate in the onset of the Warburg effect.

Recently, some signals and genes involved in anabolic stimulation, and in connection with glycolysis, were discovered. It was found that when cancer cells are confronted with serine deprivation, they activate the mTOR pathway to stimulate PKM2 protein synthesis, which in turn shifts glycolysis to its anabolic mode, thereby providing serine through the phosphorylated pathway (51). It was further discovered that in addition to mTOR, the protein TP53, a target of p53 tumor-suppressor, spares the available serine for glutathione synthesis and limits other utilizations (52). In addition to mTOR and P53, the HIF1 α pathway was shown to control PKM2 and PDK1 expression under hypoxia. The former protein drives anabolism from glycolysis, while the latter blocks fueling of the Krebs cycle with acetyl-coA derived from glucose. The oncogene N-MYC was recently shown to induce a large-scale remodeling of energy metabolism in human cancer cells, with an activation of fatty-acids oxidation concomitant with a stimulation of glycolysis (53). Analysis of C-MYC bioenergetics properties also showed that activation of this oncogene stimulates OXPHOS, redirects glutamine

toward lipids synthesis, and give the preference to glutamine instead of glucose to fuel the energetic machinery (54).

The inhibition of P53 tumor suppressor also triggers the stimulation of glycolysis (notably via TIGAR inhibition), along with the inhibition of oxidative phosphorylation via respiratory chain complex IV destabilization (through SCO2 (55)). Lastly, the discovery of oxidative tumors in lymphoma by the group of Nika Danial revealed a switch toward fatty-acid utilization controlled by PPAR γ alpha, and a successful cancer-killing strategy (*in vitro*) using a PPAR γ antagonist (T0070907) (56). Of central importance for the regulation of oxidative phosphorylation, the RAS oncogene was shown to stimulate respiration, by molecular mechanisms which remain unclear (13, 15, 57–59). Cancer bioenergetics studies revealed that oxidative phosphorylation is required for K-RAS to promote tumor progression, notably through the activation of mitochondrial respiration and the subsequent production of reactive oxygen species. K-RAS also stimulates the cytosolic part of the glutamate-aspartate shuttle (GOT1, MDH1, ME1) (60) used to reoxidize the cytosolic NADH. A recent work also showed that p53 regulates the malic enzymes.

Besides the metabolic remodeling triggered by oncogenes, variations in the microenvironment can also induce pathway rewiring or branching, as discussed above in conditions of serine deprivation, or as found in situations of glutamine deprivation. Upon glutamine removal, cancer cells rely on the pyruvate carboxylase to fuel the Krebs cycle and to generate citrate by a truncated TCA (61). The metabolic remodeling that occurs in conditions of glucose deprivation is less documented despite the fact that aglycemia is encountered in tumors (we discussed this point in a recent review (25)). In addition to these biochemical studies, recent findings suggested a link between the metabolic remodeling of tumors and chemoresistance: a subclass of resistant melanomas undergo a shift toward OXPHOS which opened a therapeutic window by using OXPHOS inhibitors as oligomycin or BZ-423 (62). Likewise, metabolic remodeling has implications for epigenetics, cell anchorage, metastasis and immune response, which demonstrate the importance and complexity of its investigation.

We described above a series of metabolic remodelings found in various types of cancer cells. So far, it cannot be said that only a limited number of profiles exists in tumors, albeit with variations in the pathways utilized. Yet, one can distinguish types of remodeling patterns, the objectives of which are: (i) lipid synthesis from glutamine, (ii) serine synthesis from glutamine or pyruvate, (iii) ATP synthesis from fatty acids or amino-acids, and (iv) ROS generation by the ETC. The need for the tumor to consume building blocks such as arginine and asparagine inspired the therapeutic strategy to utilize arginase and asparaginase, which proved to be efficient. Likewise, we must understand the biological significance of the observed metabolic remodeling to efficiently target pathways of vital importance for tumor growth and progression. The inhibition of fatty acid oxidation by PPAR γ

blockers was efficient on selected lymphomas as shown in the study of Nika Danial's group (63), and the inhibition of lipolysis and subsequent fatty-acid oxidation by orlistat and etomoxir was efficient on a mice model of leukemia (64). Recently, the group of Pierre Sonveaux discovered that metastatic cells rely further on oxidative phosphorylation, and that complex I inhibition could serve as a bioenergetics target on those cells (Porporato et al. 2014). The dependency of metastatic cells on oxidative phosphorylation was also discussed in a recent review (Amoedo et al. 2014). Again, these findings indicate the need for a better stratification of human cancer based on their bioenergetic and associated biosynthetic profile. Clearly, an exhaustive evaluation of tumor proteomics cannot be done for each patient, but relevant biomarkers could help to delineate the metabolic profile of a given tumor, taken as a whole, and to propose adapted metabolic therapies. Ideally, circulating biomarkers could be discovered, and the potential of metabolomics must be considered to reach that goal. We also need to better connect, if relevant, the oncogenetic signature with the metabolic remodeling pattern, to evidence potential links between a particular subgroup of tumors (e.g., RAS mutated, or EGFR mutated, or resistant to a certain therapy) and specific metabolic features. Are MYC-driven tumors more prone to glutaminase therapy ? Are RAS-driven tumors more sensitive to OXPHOS-targeted approaches ?

A recent study by the group of JE Sarry on the anti-cancer effect of the AMPK agonist metformin (65) showed that not all leukemic cells are sensitive, and that the cell capacity to perform the Pasteur effect was a good indicator of their sensitivity. Likewise, we tested the anti-cancer effect of AICAR on different cancer cell lines (66, 67), and showed that different sensitivities as well as different modes of action could be found in each cell line. This argues again in favor of requisite a metabolic profiling of tumors prior to consider a metabolic therapy.

5) Future directions in the field of energy metabolism

As argued in this review, cancer research on tumor energy metabolism partly aims at the identification of specific mechanisms used by cancer cells to transduce energy from different sources of carbons, as glucose, fatty acids, amino-acids or ketone bodies. In 2013, around 400 publications were reported in the PubMed database with the association of the terms « cancer » and « energy metabolism ». Likewise, 90 clinical trials reported in the clinicaltrial.gov database also associated these two terms. How cancer cells transduce energy is determined by several factors which include the oncogenetic profile and the microenvironment, notably the type and concentration of available energy substrates, as well as the metabolic cross-talk with surrounding cells. The modalities of energy transduction are also closely determined by anabolic needs as amino acids, lipids and nucleic acid syntheses, which consume carbon intermediates generated by the bioenergetic pathways, thereby impacting the modalities of energy transduction and the selection of appropriate “branched pathways”

according to specific needs. Metabolic remodeling is also controlled, directly or indirectly, by numerous oncogenes and tumor suppressors. As illustrated in **Figure 8**, mitochondrial proteins interact with cancer-driving genes and associated passenger mutations (124 genes in total), as evidenced by bioinformatics using the STRING functional protein association database. A feature of the STRING analysis is to provide a score of association between two proteins, based on their genomic context, high-throughput experiments, coexpression and published articles. In our analysis illustrated in **Figure 8**, the two clusters of mitochondrial genes (left side) and cancer driving genes (right side) are connected by a limited number of links (<50 connections, for 345 proteins in total) which might suggest that only specific interactions exist between those two clusters, and that more research is required to solve that question. For instance, tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 connects with NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1 (score 0.641), succinate dehydrogenase complex, subunit C connects with platelet-derived growth factor receptor (score 0.652) and succinate dehydrogenase complex, subunit B connects with RET proto-oncogene (score 0.621). The relevance of those interactions in cancer biology remains to be addressed by dedicated analyses. Moreover, the analysis of **Figure 8** is restricted to the respiratory chain genes and the mitochondrial carriers (221 proteins) to reveal the complexity that already exists at this level. The analysis could be more exhaustive when performed on the entire MITOCARTA database of about 1500 mitochondrial proteins, which include notably the Krebs cycle proteins, but this could not be done in the scope of that review article.

Hence, to determine the metabolic profile of a tumor requires the combination of series of investigations including bioenergetics, metabolomics, proteomics and transcriptomics. Studies *in vivo* or on freshly excised tumors should be preferred to *in vitro* analyses on cancer cells which adapt to the artificial cell culture conditions and may not retain the particularities of human tumors that we need to decipher in order to propose innovative therapeutic strategies (**Figure 9**). A global analysis of catabolism and anabolism must be undertaken on those tumor samples to determine the biological objective of tumor metabolic remodeling. If serine is one end-point, a strategy aiming at serine deprivation in tumor could be developed, as done for arginine and asparagine in leukemias. Undoubtedly, *in silico* reconstruction of metabolic pathways and their deviations will help to resolve such objectives and to test the validity of different bioenergetics targets.

Moreover, the transcriptomic study of large panels of human tumors, well clinically and genetically annotated, could allow stratification of tumors in bioenergetic groups, based on the expression level of different markers involved in metabolic switches, such as ACLY, PC, IDH2/3. The direct assessment of tumor metabolic profile *in vivo* will give more accurate information on which pathway to target. However, this raises the problem of tumor internal heterogeneity (**Figure 9**). While genetic studies of tumors show the coexistence of cancer cell clones of different adaptative and resistance abilities, the biochemical studies performed on tumors do not yet take into account this

heterogeneity.

Importantly, the problem of metabolic resistance will have to be considered (**Figure 9**), as suggested by the great metabolic flexibility of cancer cells. Therefore, a better definition of the link between the large-scale metabolic remodeling of tumor and their extended oncogenetic profile is required to adapt metabolic strategies that could be the more effective. In particular, to target “nodal enzymes” at the interface between catabolism and anabolism requires (i) their identification and ii) assessment of their regulating power (flux control coefficients). However, the complexity of cell metabolism in terms of numbers of reactions and biochemical intermediates strongly impedes our capacity to perform *in vitro* metabolic and bioenergetic analyses, and thereby also the discovery of novel targets for cancer metabolic therapy. The metabolic charts indicate the existence of several sub-pathways potentially involved both in energy transduction and anabolism, but only some of them have been explored so far in the context of cancer adaptation to metabolic stress. The power of *in silico* analyses of cancer metabolism is needed to i) identify the possible routes of energy transduction linked with anabolism, ii) select the optimal ones, with the better performance and significance for cancer metabolism, and iii) designate the enzyme with the highest control of the identified pathways.

References:

- Amoedo ND, Rodrigues MF, Rumjanek FD. Mitochondria: are mitochondria accessory to metastasis? *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2014 Jun [cited 2014 Jul 27];51:53–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24661997>
- Baracca A, Chiaradonna F, Sgarbi G, Solaini G, Alberghina L, Lenaz G. Mitochondrial Complex I decrease is responsible for bioenergetic dysfunction in K-ras transformed cells. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2009/11/26 ed. 2010;1797(2):314–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19931505>
- Benard G, Bellance N, Jose C, Melser S, Nouette-Gaulain K, Rossignol R. Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2010/03/17 ed. 2010;1797(6-7):698–709. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20226160
- Bulteau A-L, Ikeda-Saito M, Szweda LI. Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry* [Internet]. 2003 Dec 23 [cited 2014 May 13];42(50):14846–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14674759>
- Caro P, Kishan AU, Norberg E, Stanley IA, Chapuy B, Ficarro SB, et al. Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* [Internet]. 2012/10/20 ed. 2012 a;22(4):547–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23079663>
- Caro P, Kishan AU, Norberg E, Stanley IA, Chapuy B, Ficarro SB, et al. Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* [Internet]. 2012/10/20 ed. 2012 b;22(4):547–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23079663>

- Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem* [Internet]. 1955;217(1):409–27. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13271404
- Chance B, Williams GR. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzym.* 1956;17:65–134.
- Cheng T, Sudderth J, Yang C, Mullen AR, Jin ES, Matés JM, et al. Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011 May 24 [cited 2014 Mar 22];108(21):8674–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3102381&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cogliati S, Frezza C, Soriano ME, Varanita T, Quintana-Cabrera R, Corrado M, et al. Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* [Internet]. 2013 Sep 26 [cited 2014 Apr 29];155(1):160–71. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3790458&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Curtis JM, Hahn WS, Long EK, Burrill JS, Arriaga EA, Bernlohr DA. Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2012 Aug [cited 2014 May 13];23(8):399–406. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3408802&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2007/11/23 ed. 2007;104(49):19345–50. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18032601
- Faubert B, Boily G, Izreig S, Griss T, Samborska B, Dong Z, et al. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metab* [Internet]. 2013 Jan 8 [cited 2014 May 5];17(1):113–24. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3545102&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Fendt SM, Bell EL, Keibler MA, Olenchock BA, Mayers JR, Wasylenko TM, et al. Reductive glutamine metabolism is a function of the alpha-ketoglutarate to citrate ratio in cells. *Nat Commun* [Internet]. 2013/08/01 ed. 2013;4:2236. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23900562>
- Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang C V, Semenza GL. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* [Internet]. 2007/04/10 ed. 2007;129(1):111–22. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17418790
- Gellerich FN, Gizatullina Z, Gainutdinov T, Muth K, Seppet E, Orynbayeva Z, et al. The control of brain mitochondrial energization by cytosolic calcium: the mitochondrial gas pedal. *IUBMB Life* [Internet]. 2013 Mar [cited 2014 May 13];65(3):180–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23401251>
- Gnaiger E. Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2009/05/27 ed. 2009;41(10):1837–45. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19467914

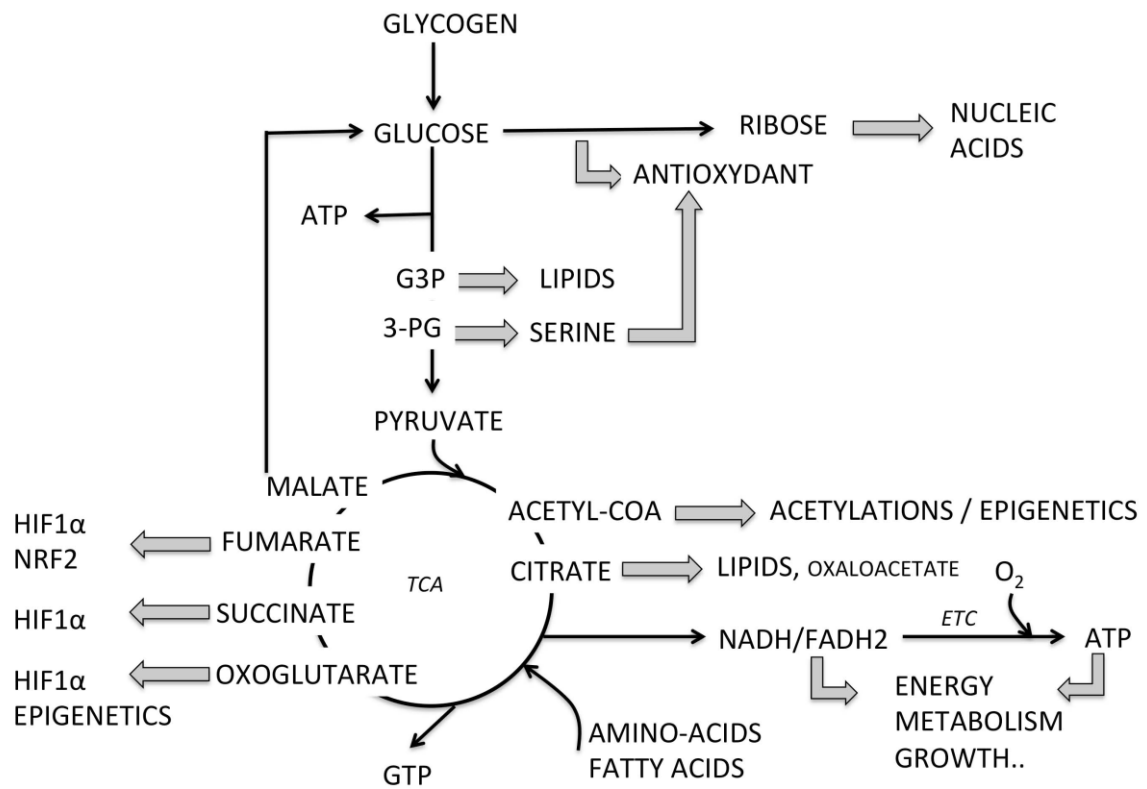
- Gough DJ, Corlett A, Schlessinger K, Wegrzyn J, Larner AC, Levy DE. Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science* (80-) [Internet]. 2009/06/27 ed. 2009;324(5935):1713–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19556508
- De Groof AJ, te Lindert MM, van Dommelen MM, Wu M, Willemse M, Smift AL, et al. Increased OXPHOS activity precedes rise in glycolytic rate in H-RasV12/E1A transformed fibroblasts that develop a Warburg phenotype. *Mol Cancer* [Internet]. 2009/08/04 ed. 2009;8:54. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19646236
- Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett* [Internet]. 2003/06/28 ed. 2003;546(1):113–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829246>
- Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, et al. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* [Internet]. 2005;8(4):311–21. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16226706
- Herzig S, Raemy E, Montessuit S, Veuthey J-L, Zamboni N, Westermann B, et al. Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science* [Internet]. 2012 Jul 6 [cited 2014 May 13];337(6090):93–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22628554>
- James AM, Collins Y, Logan A, Murphy MP. Mitochondrial oxidative stress and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2012 Sep [cited 2014 Mar 20];23(9):429–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22831852>
- Jiang P, Du W, Mancuso A, Wellen KE, Yang X. Reciprocal regulation of p53 and malic enzymes modulates metabolism and senescence. *Nature* [Internet]. 2013 Jan 31 [cited 2014 Jul 22];493(7434):689–93. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3561500&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Jose C, Bellance N, Chatelain EH, Benard G, Nouette-Gaulain K, Rossignol R. Antiproliferative activity of levobupivacaine and aminoimidazole carboxamide ribonucleotide on human cancer cells of variable bioenergetic profile. *Mitochondrion* [Internet]. 2011/03/31 ed. 2012;12(1):100–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21447405>
- Jose C, Bellance N, Rossignol R. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2010/10/20 ed. 2011 a;1807(6):552–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20955683>
- Jose C, Hebert-Chatelain E, Bellance N, Larendra A, Su M, Nouette-Gaulain K, et al. AICAR inhibits cancer cell growth and triggers cell-type distinct effects on OXPHOS biogenesis, oxidative stress and Akt activation. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2011/06/22 ed. 2011 b;1807(6):707–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21692240>
- Jose C, Melser S, Benard G, Rossignol R. Mitoplasticity: adaptation biology of the mitochondrion to the cellular redox state in physiology and carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2012/09/20 ed. 2013;18(7):808–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22989324>
- Jose C, Rossignol R. Rationale for mitochondria-targeting strategies in cancer bioenergetic therapies. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2012/07/11 ed. 2013;45(1):123–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22776740>

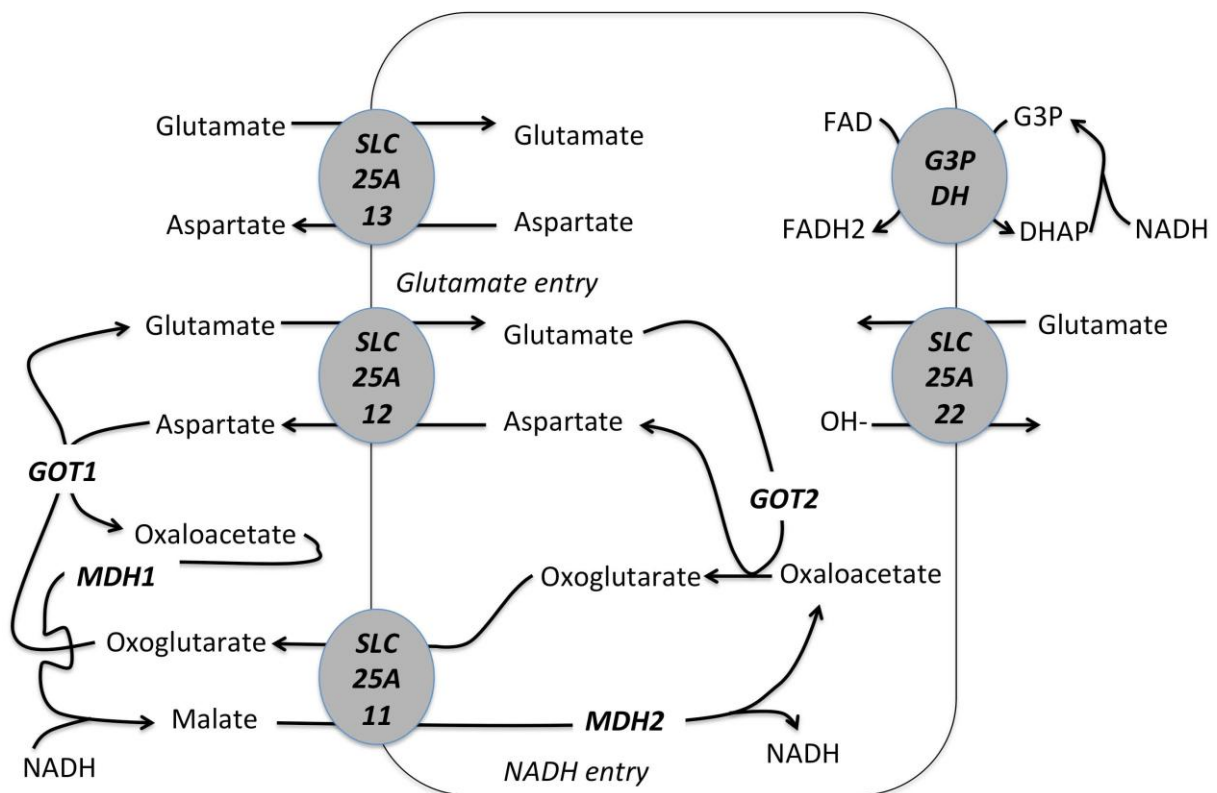
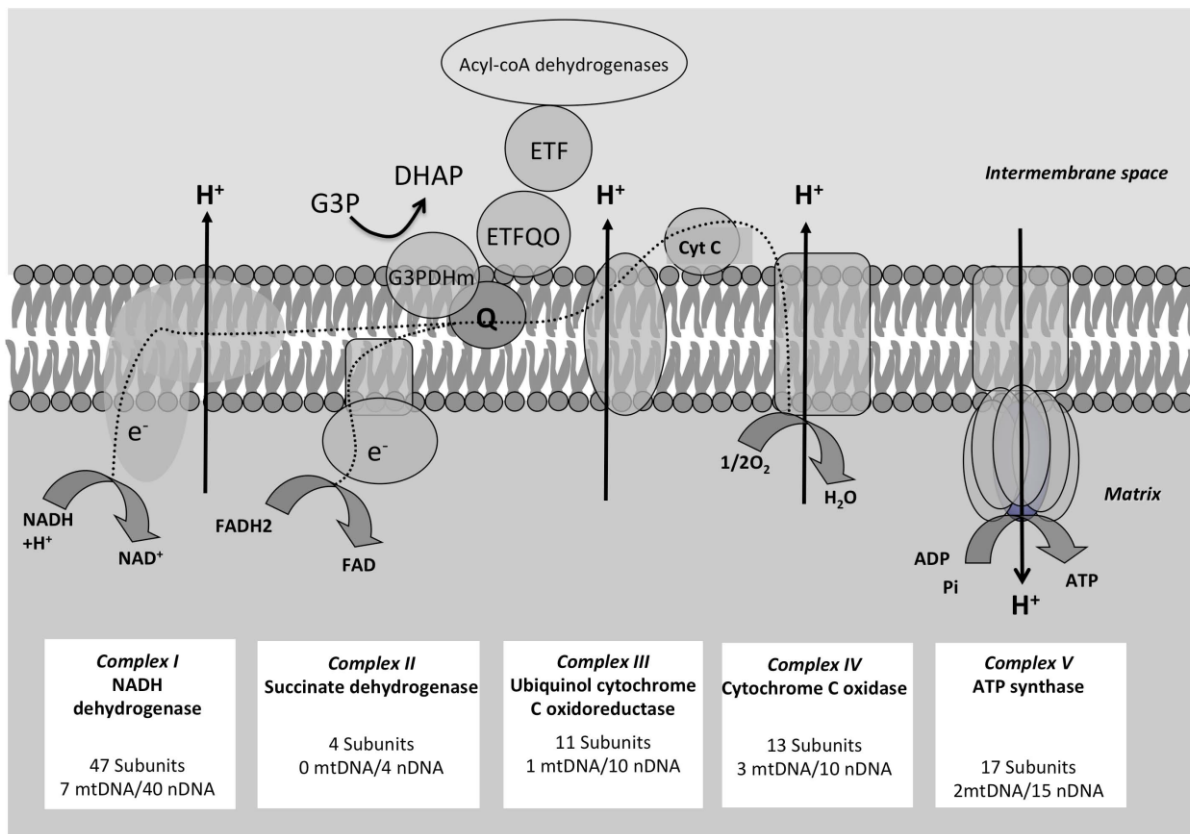
- Lopes Costa A, Le Bachelier C, Mathieu L, Rotig A, Boneh A, De Lonlay P, et al. Beneficial effects of resveratrol on respiratory chain defects in patients' fibroblasts involve estrogen receptor and estrogen-related receptor alpha signaling. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2014 Apr 15 [cited 2014 May 13];23(8):2106–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24365713>
- Lustig Y, Ruas JL, Estall JL, Lo JC, Devarakonda S, Laznik D, et al. Separation of the gluconeogenic and mitochondrial functions of PGC-1 α through S6 kinase. *Genes Dev* [Internet]. 2011 Jun 15 [cited 2014 May 13];25(12):1232–44. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3127426&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Maddocks OD, Berkers CR, Mason SM, Zheng L, Blyth K, Gottlieb E, et al. Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature* [Internet]. 2012/12/18 ed. 2013;493(7433):542–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23242140>
- Marin-Valencia I, Cho SK, Rakheja D, Hatanpaa KJ, Kapur P, Mashimo T, et al. Glucose metabolism via the pentose phosphate pathway, glycolysis and Krebs cycle in an orthotopic mouse model of human brain tumors. *NMR Biomed* [Internet]. 2012/03/03 ed. 2012 a;25(10):1177–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383401>
- Marin-Valencia I, Yang C, Mashimo T, Cho S, Baek H, Yang XL, et al. Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain in vivo. *Cell Metab* [Internet]. 2012/06/12 ed. 2012 b;15(6):827–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22682223>
- Martinez-Outschoorn UE, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP. Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis. *Cell Cycle* [Internet]. 2012 Nov 1 [cited 2014 May 13];11(21):3964–71. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3507492&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, et al. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* (80-) [Internet]. 2006/05/27 ed. 2006;312(5780):1650–3. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16728594
- Melser S, Chatelain EH, Lavie J, Mahfouf W, Jose C, Obre E, et al. Rheb regulates mitophagy induced by mitochondrial energetic status. *Cell Metab* [Internet]. 2013/04/23 ed. 2013;17(5):719–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23602449>
- Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, Mattaini KR, Yang J, Hiller K, et al. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* [Internet]. 2011/11/22 ed. 2012;481(7381):380–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22101433>
- Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfert by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 1961;191:144–8.
- Morton R, Cunningham C, Jester R, Waite M, Miller N, Morris HP. Alteration of mitochondrial function and lipid composition in Morris 7777 hepatoma. *Cancer Res* [Internet]. 1976;36(9 pt.1):3246–54. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=184946
- Mullen AR, Wheaton WW, Jin ES, Chen P-H, Sullivan LB, Cheng T, et al. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* [Internet]. 2012 a Jan 19 [cited 2014 Mar 20];481(7381):385–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3262117&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

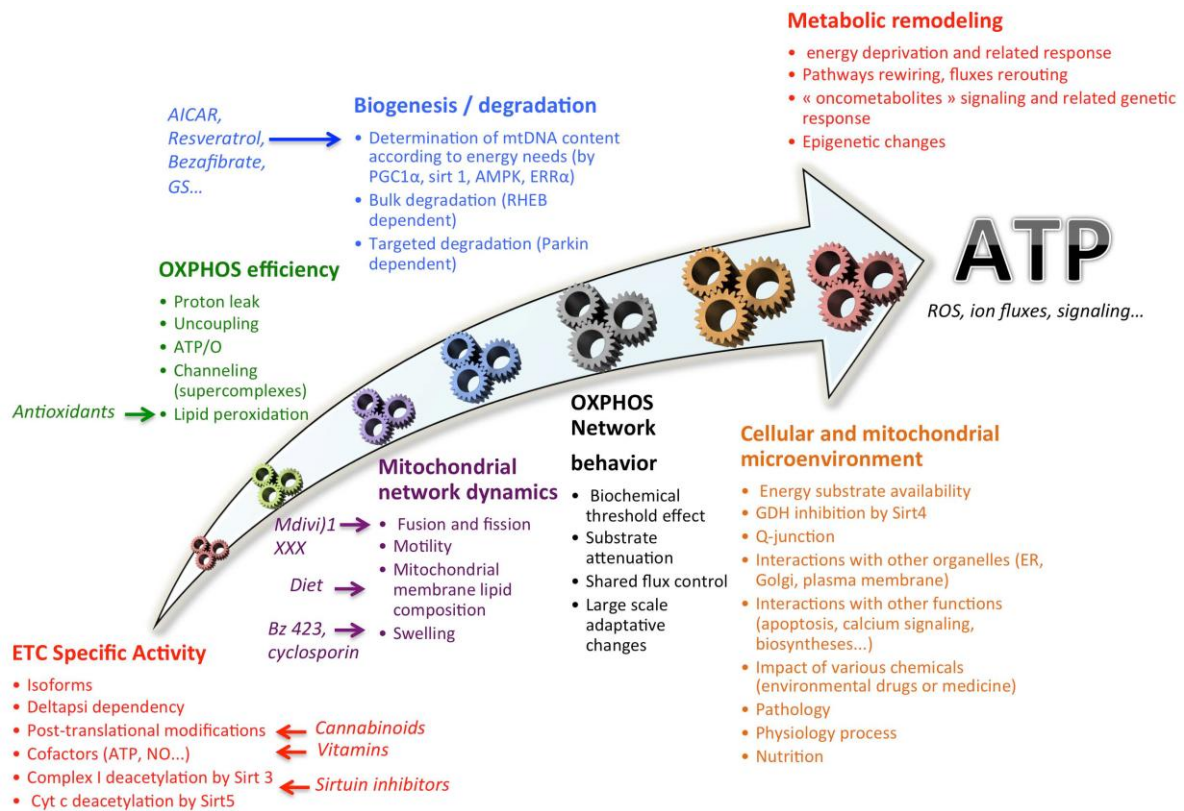
- Mullen AR, Wheaton WW, Jin ES, Chen PH, Sullivan LB, Cheng T, et al. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* [Internet]. 2011/11/22 ed. 2012 b;481(7381):385–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22101431>
- Niemann S, Muller U. Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat Genet* [Internet]. 2000;26(3):268–70. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11062460
- Ostojic J, Panozzo C, Lasserre J-P, Nouet C, Courtin F, Blancard C, et al. The energetic state of mitochondria modulates complex III biogenesis through the ATP-dependent activity of Bcs1. *Cell Metab* [Internet]. 2013 Oct 1 [cited 2014 May 13];18(4):567–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24055101>
- Palmieri F, Pierri CL. Mitochondrial metabolite transport. *Essays Biochem* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Apr 24];47:37–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20533899>
- Palorini R, Cammarata F, Balestrieri C, Monestiroli A, Vasso M, Gelfi C, et al. Glucose starvation induces cell death in K-ras-transformed cells by interfering with the hexosamine biosynthesis pathway and activating the unfolded protein response. *Cell Death Dis* [Internet]. 2013/07/23 ed. 2013;4:e732. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23868065>
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* (80-) [Internet]. 2008;321(5897):1807–12. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18772396
- Peinado JR, Diaz-Ruiz A, Frühbeck G, Malagon MM. Mitochondria in metabolic disease: getting clues from proteomic studies. *Proteomics* [Internet]. 2014 Mar [cited 2014 May 13];14(4-5):452–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24339000>
- Pollard PJ, Briere JJ, Alam NA, Barwell J, Barclay E, Wortham NC, et al. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2005;14(15):2231–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15987702
- Porporato PE, Payen VL, Pérez-Escuredo J, De Saedeleer CJ, Danhier P, Copetti T, et al. A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis. *Cell Rep* [Internet]. 2014 Jul 23 [cited 2014 Jul 24]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25066121>
- Roesch A, Vultur A, Bogeski I, Wang H, Zimmermann KM, Speicher D, et al. Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. *Cancer Cell* [Internet]. 2013 Jun 10 [cited 2014 Mar 28];23(6):811–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23764003>
- Rosignol R, Letellier T, Malgat M, Rocher C, Mazat JP. Tissue variation in the control of oxidative phosphorylations, implication for mitochondrial diseases. *Biochem J*. 2000; 347:45–53.
- Saada A. Mitochondria: mitochondrial OXPHOS (dys) function ex vivo--the use of primary fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2014 Mar [cited 2014 May 13];48:60–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24412346>
- Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, Kantarjian H, Konopleva M, Korchin B, et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 May 13];120(1):142–56. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2799198&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

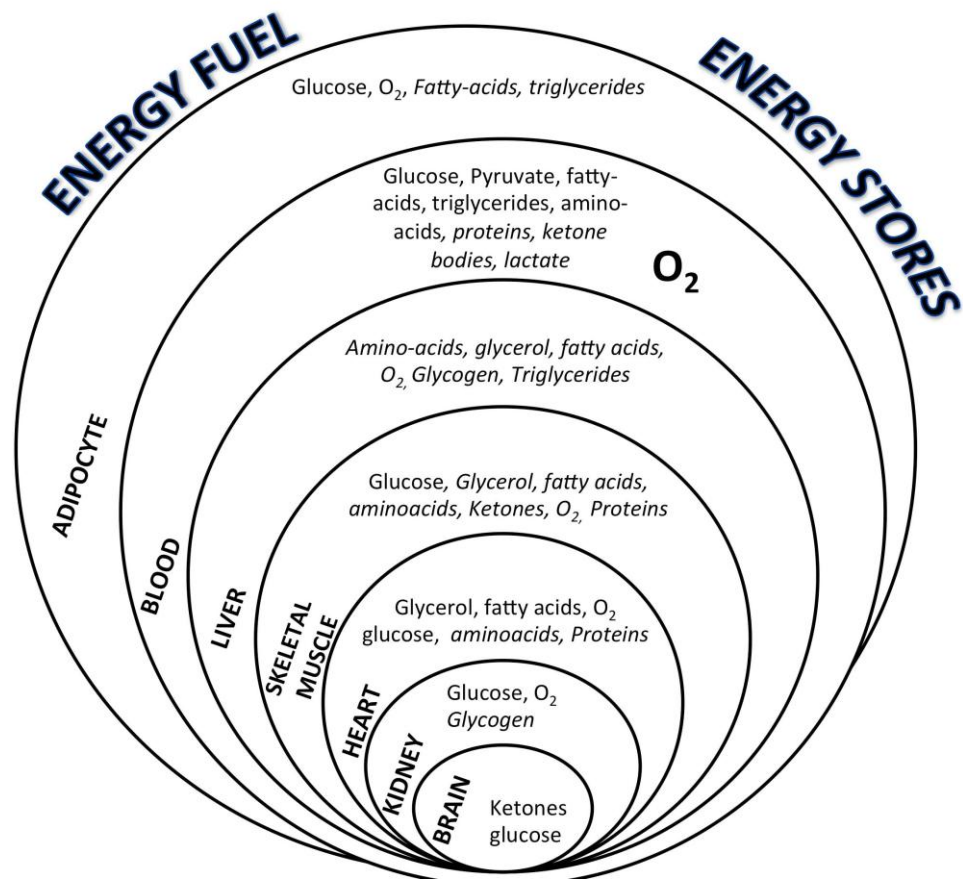
- Schagger H. Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria. *Methods Cell Biol* [Internet]. 2001;65:231–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11381596>
- Schägger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J*. 2000;19(8):1777–83.
- Scheffler IE. MITOCHONDRIA. Sons JW and, editor. New York; 1999. p. 364 pages.
- Scotland S, Saland E, Skuli N, de Toni F, Boutzen H, Micklow E, et al. Mitochondrial energetic and AKT status mediate metabolic effects and apoptosis of metformin in human leukemic cells. *Leukemia* [Internet]. 2013/04/10 ed. 2013; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23568147>
- Son J, Lyssiotis CA, Ying H, Wang X, Hua S, Ligorio M, et al. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature* [Internet]. 2013 Apr 4 [cited 2014 Mar 19];496(7443):101–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3656466&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Telang S, Lane AN, Nelson KK, Arumugam S, Chesney J. The oncoprotein H-RasV12 increases mitochondrial metabolism. *Mol Cancer* [Internet]. 2007/12/07 ed. 2007;6:77. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18053146
- Vozza A, Parisi G, De Leonardis F, Lasorsa FM, Castegna A, Amorese D, et al. UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Jan 21 [cited 2014 Jul 22];111(3):960–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3903233&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Warburg O. *Metabolism of tumors*. London: Arnold Constable; 1930.
- Wei B-R, Simpson RM, Johann DJ, Dwyer JE, Prieto DA, Kumar M, et al. Proteomic profiling of H-Ras-G12V induced hypertrophic cardiomyopathy in transgenic mice using comparative LC-MS analysis of thin fresh-frozen tissue sections. *J Proteome Res* [Internet]. 2012 Mar 2 [cited 2014 Mar 28];11(3):1561–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22214408>
- Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, et al. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010/04/28 ed. 2010;107(19):8788–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421486>
- Weinhouse S. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* (80-). 1956;124:267–8.
- Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui T V, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* (80-) [Internet]. 2009/05/23 ed. 2009;324(5930):1076–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19461003>
- Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK, et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008/11/27 ed. 2008;105(48):18782–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19033189
- Ye J, Mancuso A, Tong X, Ward PS, Fan J, Rabinowitz JD, et al. Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 May 1 [cited 2014 Mar 28];109(18):6904–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3345000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Zhang Z, Falk MJ. Integrated transcriptome analysis across mitochondrial disease etiologies and tissues improves understanding of common cellular adaptations to respiratory chain dysfunction. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2014 May [cited 2014 May 13];50:106–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24569120>
- Zhang Z, Tsukikawa M, Peng M, Polyak E, Nakamaru-Ogiso E, Ostrovsky J, et al. Primary respiratory chain disease causes tissue-specific dysregulation of the global transcriptome and nutrient-sensing signaling network. *PLoS One* [Internet]. 2013/07/31 ed. 2013;8(7):e69282. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23894440>
- Zirath H, Frenzel A, Oliynyk G, Segerström L, Westermark UK, Larsson K, et al. MYC inhibition induces metabolic changes leading to accumulation of lipid droplets in tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 Jun 18 [cited 2014 Mar 27];110(25):10258–63. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3690852&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>



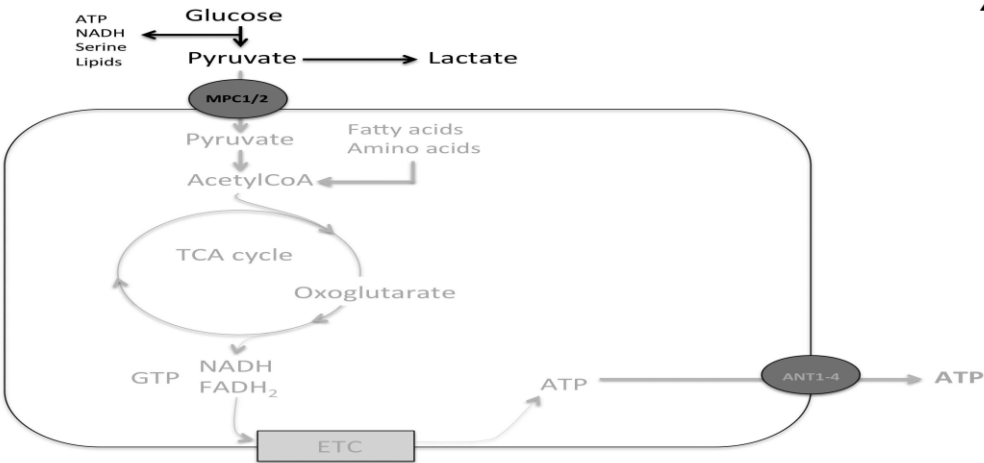






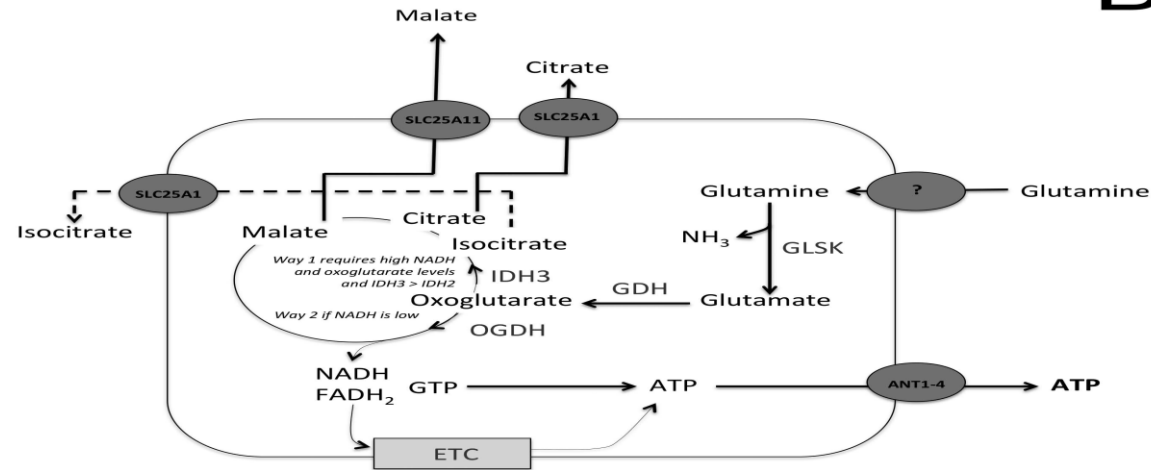
WARBURG EFFECT

A



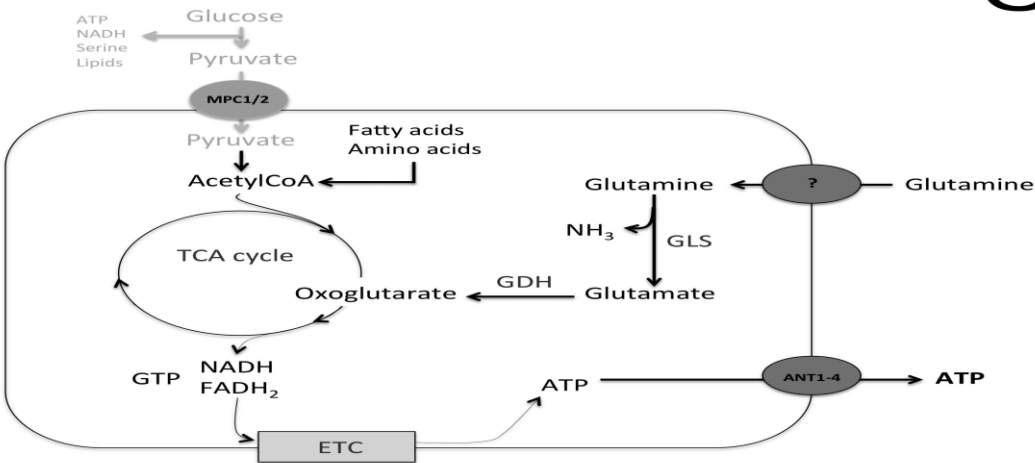
TRUNCATED KREBS CYCLE

B



OXIDATIVE TUMORS

C



The diagram illustrates the metabolic pathway starting from Glucose. Glucose is converted to Pyruvate, which then enters the mitochondrion via MPC1/2. Inside, Pyruvate is converted to AcetylCoA, which enters the TCA cycle. The TCA cycle produces NADH and FADH₂, which enter the ETC to produce ATP. Glutamine is converted to Glutamate by GLS, releasing NH₃, which enters the TCA cycle as Oxoglutarate. Glutamate is also converted to ATP by ANT1-4. The diagram is labeled 'Metabolic pathway'.

The diagram illustrates the metabolic pathways for glutathione synthesis and protein synthesis, regulated by NADH levels. Key components include:

- Glucose Metabolism:** Glucose is converted to 3PG, then to Malate, Oxaloacetate, and Phosphoenolpyruvate, leading to AcetylCoA and Lipids.
- Glutathione Synthesis:** Serine and Glutamate are precursors for Glutathione. Glutamate is converted to Oxoglutarate by IDH3, which is regulated by NADH levels (high NADH increases Oxoglutarate levels).
- Protein Synthesis:** Oxoglutarate is converted to Isocitrate by IDH1, which is regulated by NADH levels (low NADH increases Isocitrate levels). Isocitrate is then converted to Citrate by IDH3, which is regulated by NADH levels (low NADH increases Citrate levels).
- Regulation:** NADH levels regulate the activity of IDH1, IDH3, and OGDH. High NADH favors Oxoglutarate synthesis, while low NADH favors Isocitrate and Citrate synthesis.
- Other Pathways:** Glutamine is converted to Glutamate by GLSK, which is regulated by NADH levels (low NADH increases Glutamate levels). Glutamate is also converted to Oxoglutarate by OGDH, which is regulated by NADH levels (low NADH increases Oxoglutarate levels).
- Energy Production:** ATP is produced from GTP and ADP by ANT1-4, which is regulated by NADH levels (low NADH increases ATP production).

This diagram illustrates the metabolic pathways involving the TCA cycle. Key components include:

- ATP** and **NADH** are produced from **Serine** and **Lipids**.
- Glucose** is converted to **Pyruvate** via **MPCK2**.
- Pyruvate** can be converted to **AcetylCoA** or enter the **TCA cycle** via **GOT1** and **SLC25A12**.
- AcetylCoA** enters the **TCA cycle** via **GOT2**.
- The **TCA cycle** involves **Oxaloacetate**, **Oxoglutarate**, and **Malate**.
- Oxoglutarate** is converted to **Malate** via **MDH2**.
- Malate** enters the **ETC** (Electron Transport Chain) via **MDH1**.
- The **ETC** produces **ATP**, **NAD+**, and **FAD**.
- MDH1** and **MDH2** are involved in the conversion of **Oxoglutarate** to **Malate**.

The diagram illustrates the TCA cycle and its integration with other metabolic pathways. Glucose is converted to Pyruvate, which enters the TCA cycle via MPC1/2. Pyruvate is also converted to AcetylCoA, which enters the TCA cycle. The TCA cycle includes Oxaloacetate, Oxoglutarate, and Aspartate. Oxoglutarate is converted to Aspartate by GOT2. Aspartate is converted to Glutamate by GLSK. Glutamate is converted to Glutamine. Glutamine is converted to Asparagine, Threonine, Methionine, and Lysine. Aspartate is also converted to Asparagine, Threonine, Methionine, and Lysine. The TCA cycle is linked to the ETC (Electron Transport Chain) via NADH and FADH₂, which are converted to NAD⁺ and FAD. The ETC is linked to the UCP2 (Uncoupling Protein 2) pathway, which is involved in the regulation of mitochondrial uncoupling. The UCP2 pathway is linked to the regulation of the TCA cycle via H⁺ and Pi.



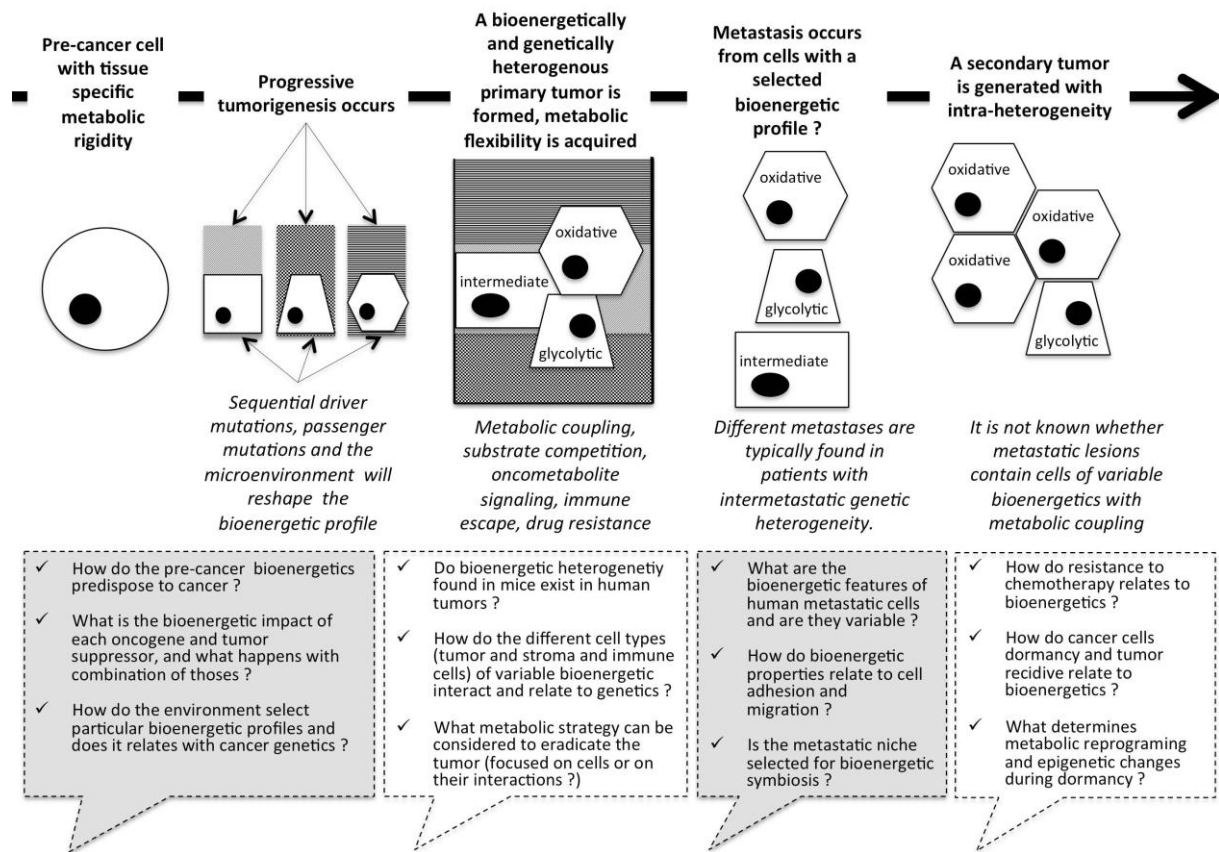


Figure Legends

Figure 1 : Overview of energy metabolism pathways

In this chapter we refer to the production of biological energy in the form of adenosine triphosphate or ATP. This process occurs primarily through glycolysis, the end product of which is pyruvate and through subsequent oxidative phosphorylation. In most tissues, the pyruvate enters the mitochondrion and generates acetyl-coA which is further oxidized at the level of the Krebs cycle to produce ATP, NADH and FADH₂. The latter reduced equivalents are further oxidized by the respiratory chain to generate ATP via chemiosmosis, at the level of the F₁F₀ ATPsynthase. This second mechanism of ATP production is referred to as oxidative phosphorylation. The Krebs cycle can also process alpha-ketoglutarate formed from glutamine, via glutaminolysis, or acetyl-coA generated from fatty acids beta-oxidation. Those anaplerotic pathways are of particular importance in cancer cells. The citrate produced in the Krebs cycle can also escape this cycle (truncated Krebs cycle) and serve for lipid synthesis. As discussed in this chapter, this canonic description of energy metabolism does not apply to several cancers where the pathways are truncated (glycolysis and Krebs), rewired (anaplerotic entries from canonical or non-canonical glutaminolysis) and branched (lipid or serine synthesis from glycolysis). Therefore, while the pentose phosphate pathway, and the Krebs cycle generate both reducing equivalents (NADH, NADPH, FADH₂), ATP and GTP used for energy needs, those pathways also produce intermediates such as 3PG used for biosynthesis. Some metabolites such as fumarate can also modulate transcription factors as NRF2 while oxoglutarate can serve as substrate for HIF1alpha degradation and acetyl-CoA for histone acetylation. This figure illustrates the close link between catabolism, anabolism and genetic / epigenetic regulations.

Figure 2 : The respiratory chain

For mammals, the respiratory chain consists of four enzyme complexes (complexes I – IV) and two intermediary substrates (coenzyme Q and cytochrome c). The NADH, H⁺ and FADH₂ produced by the intermediate metabolism are oxidized further by the mitochondrial respiratory chain to establish an electrochemical gradient of protons, which is finally used by the F₁F₀-ATP synthase (complex V) to produce ATP, the only form of energy used by the cell. In this simple representation of the respiratory chain, the supramolecular organization (supercomplexes, dimers) is not shown. Of importance for this chapter, electrons can also be delivered to the respiration chain at the level of coenzyme Q by the ETF system or by the glycerol 3 phosphate dehydrogenase system. The respiratory chain can generate reactive oxygen species, and current research in the field of cancer metabolism indicate that such feature plays a role in metabolic remodelling, notably in metastasis. Uncoupling proteins can be expressed in the inner mitochondrial membrane to modulate ROS production. Also, different isoforms of complex IV subunits were found in cancer cells (COX4-1 and COX-2), depending on HIF1alpha

stabilization. Lastly, mutations in mtDNA, impacting respiratory chain complexes activity were found in a large number of tumors.

Figure 3: NADH import in the mitochondrion:

Mitochondria from mammals differ from those of yeast in numerous ways, one being the capacity to import NADH to fuel the respiratory chain. In yeast, a NADH transporter exists. In mammals, the NADH produced by glycolysis and other cytosolic reactions must enter the mitochondrion to be reoxidized by the respiratory chain, and this occurs by NADH-shuttle systems. The so-called malate-aspartate shuttle is illustrated in this figure. The cytosolic malate dehydrogenase consumes NADH to produce malate from oxaloacetate. This malate enters the mitochondrion (in exchange with α -ketoglutarate) where it is converted back into oxaloacetate and NADH. Oxaloacetate is transformed into aspartate by consuming glutamate, using the enzyme glutamate aspartate aminotransferase. This glutamate is imported by the glutamate-aspartate antiporter (SLC25A12, Aralar, AGC1), so that aspartate is exported in the cytosol where it is converted again into oxaloacetate. The net effect of this system is NADH entry in the mitochondrion.

Figure 4 : Multi-site regulation of OXPHOS

The regulation of ATP transduction occurs at several sites depicted along the arrow. At the level of respiratory chain, isoform can differ between tissues (the heart and liver isoforms of COX for instance), complexes can harbor post-translational modifications (as acetylation, nitrosylations, phosphorylations, methylations...), supercomplexes cohesion can vary and impact ATP synthesis, and the expression level of those complexes can also vary between tissues or according to the situation (temperature...). ATP synthesis capacity of the mitochondrion is also modulated at the level of membrane composition which impacts its fluidity and leakiness to protons. The coupling of ATP synthesis to NADH and FADH₂ oxidation further depends on the intrinsic properties of the proton pumps (slipping) and of the ATP synthase and the membrane permeability to proton (uncoupling and decoupling can occur). The overall shape of the mitochondrial network, either fused or fragmented can also alter ATP synthesis. The role of fusion and fission proteins as bioenergetic modulators still remains unclear. The principles of mitochondrial bioenergetics and pharmacology must be considered when trying to analyse or extrapolate the genotype phenotype relationships. For instance, the biochemical threshold effect defines a value of individual ETC complexes inhibition above which the overall flux of respiration will collapse. This value is high (around 70%) and varies between tissues. The control coefficient of ETC complexes is also different in the different tissue, providing a biochemical basis for the tissue specificity of mitochondrial disorders. Another level of bioenergetics regulation concerns energy substrates delivery to the chain, with the phenomena of channelling, metabolic remodeling and hormonal control of glucose and lipids catabolism. A recent layer of bioenergetics control was found in the form of metabolic remodeling as extensively discussed in this

chapter. Genetic or environmental toxic mediated alteration of each of those levels was found in human diseases (mitochondrial diseases, rare motoneuron disorders, metabolic syndrome, neurodegenerative diseases..) and drugs are also being developed to stimulate energy transduction at each of those levels.

Figure 5 : Metabolic rigidity and metabolic flexibility

The different tissues present with specificities in the type of energy substrate primarily used for energy synthesis. A metabolic coupling between tissues exists to cope with this metabolic rigidity. The different tissues also differ in the form of energy they store. When a normal tissues undergo cancer transformation, this metabolic rigidity is lost and the phenomenon of metabolic flexibility is observed. This is not a general rule as this feature also depends on the bioenergetics environment of the cancer cells.

Figure 6 : Examples of Metabolic Remodeling

In addition to the classic Warburg effect (high glycolysis and poor OXPHOS), other types of metabolic remodeling were recently described in cancer cells. They include lipid synthesis from glutamine or oxidative tumors deriving ATP from fatty acid oxidation and from amino-acids degradation. This is discussed in the text.

Figure 7 : Four modes of glutamine utilization

Different types of glutamine catabolism can occur depending on the cellular needs and the bioenergetic constraints. The 4th mode is hypothetical based on recently published data on the function of UCP2. See explanation in the text.

Figure 8 : Functional association between respiratory chain proteins and cancer-driving and passengers genes. To visualize the links between ETC proteins and mitochondrial carriers (HuGo database) and cancer driving genes (from we used the functional association database STRING (<http://string-db.org/>)). STRING quantitatively integrates interaction data from four sources of informations including the Genomic Context, High-throughput Experiments (microarrays), Conserved Coexpression analyses and knowledge from Pubmed.

Figure 9 : Progressive bioenergetic remodeling during tumorigenesis

We figured the transformation process of a pre-cancer cell to a cancer one, and discussed the bioenergetic change that occur during carcinogenesis. The central question of tumor bioenergetic heterogeneity is raised as well as the role of the oncogenes and tumor suppressors and that of the environment.

ARTICLE 1 : HRASG12V
ACTIVATES NON-CANONICAL
SERINE BIOSYNTHESIS
Soumis, confidentiel

ARTICLE 2 : GLUCOSE
DEPRIVATION REPARTERNS
CANCER CELLS METABOLISM
AND UNCOVERS THE
FUNCTION OF XXXX IN
PHOSPHOENOLPYRUVATE
EXPORT FROM
MITOCHONDRIA
Soumis, confidentiel

ARTICLE 3 :
METABOPROTEOMIC
CHARACTERIZATION OF
HUMAN LUNG TUMORS
EVIDENCES TWO
BIOENERGETIC SUBGROUPS
Soumis, confidentiel

DISCUSSION GENERALE

Dans ma thèse j'ai étudié certains déterminants du remodelage métabolique selon trois parties distinctes. Je discute ici de mes résultats de manière globale car il existe de nombreux recouvrements entre les trois parties. En particulier, nous avons identifié sept points de réflexion et de discussion principaux :

- 1/ Le caractère oxydatif des cellules cancéreuses
- 2/ Le profilage métabo-bioénergétique
- 3/ La biosynthèse de la sérine et de ses dérivés
- 4/ Le transporteur XXXX
- 5/ Les modifications génétiques lors du remodelage métabolique
- 6/ L'appariement bioénergétique
- 7/ La thérapie bioénergétique du cancer

1. Le caractère oxydatif des cellules cancéreuses

L'hypothèse de dysfonction mitochondriale dans le cancer proposée par Otto Warburg dans les années 30 (cf. Introduction), il y a donc quasiment un siècle, ne fut infirmée ou clarifiée que lors des cinq ou dix dernières années.

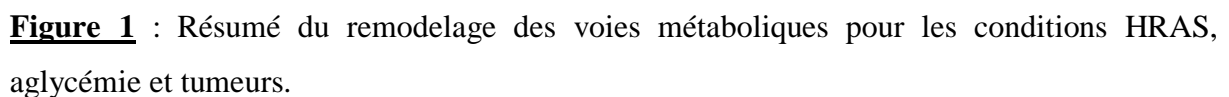
Tout d'abord, des études sur des nombreuses lignées cancéreuses en culture ont révélé pour la plupart d'entre-elles la capacité à respirer dans un oxygraphe (Hansatech, Oroboros, Seahorse), témoignant d'une activité mitochondriale sensible à la roténone ou au KCN (Emerling et al., 2007; Garedew et al., 2005; Severinghaus and Astrup, 1986). L'observation d'une respiration souvent plus faible dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules non-cancéreuses de même tissu (peu d'études réalisées) a permis de proposer le terme de mitochondries peu efficaces (low-efficiency) dans le cancer (Bellance et al., 2009). Par la suite, les travaux du groupe de Deberardinis sur des glioblastomes murins (Marin-Valencia et al., 2012) et les travaux du groupe de Sonveaux sur des modèles murins de mélanomes (Porporato et al., 2014b) et de différents carcinomes injectés dans des souris (Sonveaux et al., 2008b), puis les travaux du groupe de Nika Danial sur des lymphomes (Caro et al., 2012) ont montré l'existence de cellules cancéreuses oxydatives *in situ* et *ex situ*. Ces observations ont

changé le paradigme et ont permis d'infirmer l'hypothèse de Warburg, voire de la préciser. Il faut reconnaître l'apport indéniable d'Otto Warburg qui déchiffra le premier remodelage métabolique du cancer, et également remarquer qu'il a fallu un siècle et l'avènement de nombreuses technologies, comme le traçage métabolique *in vivo* pour poursuivre son travail et faire évoluer considérablement nos connaissances.

Dans ma thèse, j'ai montré que lorsque l'oncogène HRAS est activé par la mutation G12V, cela s'accompagne d'une augmentation de la respiration mitochondriale, de la consommation de glutamine destinée à la production de la sérine et de ses dérivés antioxydants, et d'une augmentation de la production d'ATP par les mitochondries. Les mesures en RMN du devenir du glucose marqué au C13 témoignent aussi d'une réduction de l'effet Warburg suite à l'activation de HRAS. Ces données sont importantes car elles renforcent l'idée selon laquelle la fonction mitochondriale est importante dans la genèse du cancer, et que certains déterminants génétiques sont impliqués dans ce phénomène. Une activation des OXPHOS fut aussi observée lors de l'activation de C-MYC dans de nombreux modèles (Dang et al., 2009; Graves et al., 2012; Jose et al., 2011). Cet oncogène C-MYC joue un rôle dans le remodelage médié par HRAS puisque nous observons une augmentation de son expression lorsque HRAS est activé, et nous montrons que cela dépend de l'inactivation de AMPK puis de l'activation de mTOR. Ce lien HRAS/AMPK/mTOR fut mis en évidence dans ma thèse, à notre connaissance, et renforce notre savoir sur les voies de signalisation impliquées dans le cancer. Un article récent a montré comment le complexe mTORC2 régule C-MYC (Masui et al., 2013), en accord avec nos résultats. Ainsi, le couple HRAS-C-MYC, déjà identifié comme coopérants dans plusieurs études sur la carcinogenèse, pourraient aussi collaborer lors du remodelage métabolique des cellules cancéreuses. C-MYC est un oncogène clef dans la régulation du métabolisme de la glutamine et nous confortons cette idée.

Dans la partie 2, les cellules HeLa deviennent oxydatives, par nécessité, lorsqu'elles sont forcées à survivre en aglycémie. Cela révèle la plasticité métabolique des cellules cancéreuses, et suggère la difficulté qu'il peut y avoir à réaliser une thérapie bioénergétique. Les cellules HeLa devenues oxydatives ont acquis d'autres propriétés qui seront discutées plus bas. Le caractère oxydatif des HeLa en aglycémie s'explique en partie par l'apport de FADH₂ à la chaîne respiratoire à partir de la dégradation des acides aminés branchés, en utilisant le système ETF.

Les trois parties de ma thèse montrent donc qu'il est possible d'observer des cellules cancéreuses oxydatives et que cela peut résulter de nombreuses manières, soit génétique (HRAS), soit environnementale (privation en glucose) ou par un mélange des deux effets (tumeurs excisées).



129

respiratoire est surexprimée, tout comme les enzymes du cycle de Krebs et la voie non-canonique de consommation de glutamine. Les enzymes de la β -oxydation sont aussi surexprimés mais nous n'avons pas vérifié leur activité. Enfin certains enzymes de la dégradation des acides aminés sont aussi augmentés de même que le système ETF qui assure la liaison avec la chaîne respiratoire. Dans le cas des cellules OXPHOS générées par aglycémie, la chaîne respiratoire est surexprimée tout comme la voie de dégradation des acides aminés branchés (valine, leucine et isoleucine), alors que le cycle de Krebs est partiellement inhibé (la voie NCSSG est activée). Dans le cas des tumeurs de poumon, les tumeurs oxydatives présentent une augmentation au niveau de certains complexes de la chaîne respiratoire et de la glutaminolyse non-canonique. Ces observations montrent bien la nécessité d'opérer un profilage métabolique détaillé, car un caractère OXPHOS peut être obtenu de différentes manières et ne suffit pas pour inférer sur les modalités du remodelage métabolique sous-jacent. Nous pouvons noter ici aussi que la biogenèse mitochondriale, ou la quantité globale d'organites, ou autrement dit le volume du réseau mitochondrial et la quantité de protéines qui le compose n'a pas varié de manière globale, dans HRAS comme dans GAL. Les modifications semblent porter spécifiquement sur des protéines clefs, qui peuvent alors les désigner comme cibles potentielles pour des approches pré-thérapeutiques. A l'inverse de la réponse rétrograde souvent observée dans le cas de pathologies mitochondriales (Benard et al., 2012), c'est à dire l'augmentation générale de la masse mitochondriale dans le muscle, l'acquisition du caractère oxydatif dans les cellules cancéreuses repose sur des modifications plus fines et spécifiques.

L'analyse cellulaire des remaniements associés au phénotype oxydatif montre aussi que l'activation de la respiration mitochondriale n'est peut-être pas l'objectif principal des cellules cancéreuses, mais plutôt une adaptation opportune ou associée. Nous pensons que l'objectif principal reste l'anabolisme sélectif, et notamment la biosynthèse d'antioxydants dans le cas de HRAS (taurine, phosphocréatine, glutathion..).

Dans le cas de HRAS, le caractère oxydatif est aussi associé à une forte déviation de la glutamine vers la synthèse de phospholipides (choline) mais aussi de taurine, un antioxydant avec des propriétés de signalisation encore peu étudiées. La voie utilisée met en jeu la navette malate-aspartate et transporte du NADH dans la mitochondrie, qui doit alors être oxydé. La glutamine se retrouve dans la sérine et la cystéine en grande quantité, et les défenses anti-oxydantes sont aussi augmentées dans ce contexte. La cystéine est utilisée pour la synthèse de glutathion mais aussi de taurine. L'étude par RMN du devenir de la glutamine montre

l'acheminement vers la sérine, par les deux voies décrites à ce jour : la voie du cycle de Krebs (voie 'C2') avec extrusion d'oxaloacétate ou de malate comme dans le cas de la néoglucogenèse, et la voie de la réduction carboxylative de la glutamine, lorsque le cycle de Krebs fonctionne à l'envers (marquage du C3 de la sérine). La voie 'C3' reste mineure par rapport à la voie 'C2', mais il faut noter que la voie 'C3' n'est pas empruntée dans les cellules E6E7. Le caractère oxydatif des cellules cancéreuses où HRAS est activé témoigne d'une activité de biosynthèse importante, et la mitochondrie peut fournir de l'ATP nécessaire à ces synthèses. Dans le cas des cellules OXPHOS générées par aglycémie (partie 2), la respiration est cruciale car la glycolyse ne peut pas avoir lieu. Le caractère oxydatif est associé dans ce cas à la mise en place d'une voie de biosynthèse de la sérine à partir de la glutamine et du pyruvate, et là encore nous observons une forte utilisation de la glutamine et du pyruvate pour la synthèse de lipides. Il faut aussi indiquer qu'en aglycémie, les cellules HeLa dégradent les acides aminés branchés et relient la chaîne respiratoire via le complexe ETF. Cela explique en partie l'augmentation de respiration observée.

Peut-on proposer à ce stade que les cellules cancéreuses en mode OXPHOS réalisent des synthèses importantes pour leur croissance ?

Les tissus normaux (sauf le tissu adipeux et hépatique) utilisent les acides gras circulants comme sources d'énergie, ou pour la synthèse des phospholipides. Dans le cas de tissus cancéreux, la synthèse d'acides gras et de phospholipides semble favorisée. Des études de lipidomique montrent qu'au cours de la carcinogenèse 93% des acides gras proviennent de la synthèse *de novo* malgré l'apport constant en acides gras extracellulaires (Medes et al., 1953; Menendez and Lupu, 2007). Il a été montré que lorsque Ras est surexprimé, les cellules présentent un enrichissement en acide phosphatidique, en diacyglycérol et en céramide (Martin et al., 1997). Il est indéniable que dans ces deux modèles, HRAS et aglycémie, la biosynthèse de phospholipides est accrue, en parallèle de la respiration mitochondriale. Une observation intéressante dans le modèle d'aglycémie tient au fait que la bêta-oxydation est réduite, et le renouvellement des phospholipides accru. Cela indique que les acides gras sont préservés de la bêta-oxydation pour participer à la synthèse des phospholipides. Dans ce cas, il n'y a pas de synthèse *de novo* des acides gras, mais une utilisation des acides gras existants. Pour produire un phospholipide, il faut brancher ces acides gras sur du glycérol dont la synthèse s'effectue à partir du DHAP provenant de la glycolyse ou de la néoglucogenèse. Nous observons un fort marquage des phospholipides en GAL, mais nous n'avons pas montré que ce marquage est sur le glycérol ou sur l'acide gras. Nous allons vérifier ce point en

réalisant une hydrolyse des phospholipides et une analyse de la radioactivité. Si l'acide gras est marqué, il sera observé sur le profil de migration. Le glycérol ne migrant pas en TLC, dans ce cas le marquage restera dans le haut de la plaque de chromatographie. Ce point important pourrait révéler qu'en aglycémie on opère à un recyclage des acides gras plutôt qu'à une véritable synthèse *de novo*.

La sérine joue un rôle clef, car elle donne lieu à la biosynthèse de choline, et la phosphatidylcholine peut ensuite générer la phosphatidylsérine un autre composant majeur des membranes cellulaires. La synthèse de lipides permet donc la production des phospholipides nécessaire à la formation des nouvelles membranes des cellules en division constante. Cependant la composition en phospholipides entre cellules cancéreuses et cellules saines est différente. Les cellules cancéreuses ont une composition membranaire enrichie en phospholipides saturés et monoinsaturés qui pourraient protéger les membranes contre les ROS (Rysman et al., 2010). Il aurait été intéressant d'étudier la composition en phospholipides mitochondriaux dans ces deux modèles pour voir si des différences existent, potentiellement en lien avec l'efficacité bioénergétique améliorée. Les lipides sont également une réserve énergétique importante en cas de carence en nutriments (glucose, glutamine...) la cellule cancéreuse garde son autonomie énergétique tout en se reprogrammant afin de survivre à son environnement changeant. De plus, les lipides interviennent dans la régulation post-traductionnelle des protéines. Le palmitate et le myristate peuvent se lier de manière covalente à des résidus cystéines ou glycine des protéines, c'est la prénylation. La prénylation est essentielle pour l'activité et l'adressage correct des protéines. Par exemple, la prénylation de RAS est essentielle à son ancrage à la membrane et donc à son activation (Baines et al., 2012). L'Isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase (Icmt) est la dernière enzyme qui permet la prénylation complète. Récemment, un article explique qu'une suppression de l'Icmt induit l'autophagie et une inhibition de la croissance tumorale par réduction des OXPHOS car les complexes I, II et III sont Icmt-dépendants. L'inhibition d'Icmt induit donc une diminution de l'ATP mitochondrial, des anomalies dans le cycle de Krebs et la suppression de l'anabolisme. L'Icmt joue un rôle très important dans la prénylation des protéines OXPHOS permettant la croissance tumorale (Teh et al., 2014). La synthèse de lipides *de novo* jouerait-elle un rôle dans la régulation post-traductionnelle de protéines?

Nos résultats soulèvent une question importante dans le cas de l'effet de HRAS : la biosynthèse de sérine et de lipides pourrait s'effectuer à partir de la glycolyse, alors pourquoi ne pas l'utiliser ?

Le modèle HRAS révèle une observation intéressante qui pourrait apporter un élément de réponse dans cette discussion: la "compartmentation" du pyruvate. En effet, dans les cellules précancéreuses E6/E7, la majorité du glucose se retrouve dans le pyruvate et lui-même dans le lactate. Toutefois, une partie du pyruvate provient d'une source non identifiée, probablement de la glutamine. Lorsque HRAS est activé, ce pool de pyruvate non marqué à partir du glucose augmente. Cela montre que la glycolyse ne fournit pas ou peu d'éléments carbonés au cycle de Krebs, et que sa fonction de « producteur de lactate » pourrait posséder une signification biologique importante, soit extracellulaire comme dans le couplage métabolique de Pierre Sonveaux, soit pour d'autres activités intracellulaires inconnues. Cette vision d'un "découplage" de la glycolyse des besoins en ATP cellulaire et surtout de l'anabolisme renforce le besoin de voies alternatives, et celles-ci utilisent la mitochondrie comme nous l'avons montré pour la synthèse de sérine ou de lipides. Dans les tumeurs oxydatives, l'enzyme ATP-citrate lyase est augmentée, confortant l'idée que les tumeurs OXPHOS sont très actives pour la synthèse de lipides. Cela pourrait aussi s'expliquer par un fort stress oxydant, car là aussi les défenses anti-oxydantes sont augmentées, de même que le métabolisme des aldéhydes. Jerby et al. émettent l'hypothèse que l'anabolisme (production d'acides gras) serait initié à un stade précoce du développement tumoral alors que la détoxification des ROS proviendrait lors de stades plus tardifs de la carcinogenèse (Jerby et al., 2012).

De plus, une étude sur l'oncogène KRAS a montré que son activation induit un découplage de la glycolyse de la voie des pentoses phosphates (Ying et al., 2012) pour ne garder que la partie non-oxydative qui produit du NADPH. Cela procure à la glycolyse un rôle spécifique dans la régénération des défenses antioxydantes. Cette observation pourrait s'appliquer à notre étude sur HRAS car nous observons une augmentation de la transkétolase impliquée dans la branche non-oxydative du PPP.

Dans le cas de HRAS, le fuel énergétique pourrait être le NADH généré par la navette malate-aspartate alors activée, mais aussi le FADH₂ apporté par la dégradation des lipides, comme observé par l'activation des enzymes de la β -oxydation et la surexpression du système ETF, qui connecte la β -oxydation à la réduction du coenzyme Q. Dans notre étude sur HRAS, le blocage de ETF avec le DBMIB tue les cellules cancéreuses. Le système ETF d'approvisionnement de la chaîne respiratoire demeure peu étudié dans le cas du cancer, or nous observons sa surexpression dans les deux premières parties de la thèse. L'ETF génère des ROS (Rodrigues and Gomes, 2012), ce qui pourrait aussi expliquer l'augmentation des

défenses anti-oxydantes. Dans la partie sur l'aglycémie, le système ETF est lié à la voie de dégradation des acides aminés branchés qui joue un rôle important pour produire du FADH₂ et de l'acétate.

Pour conclure sur le caractère oxydatif des cellules cancéreuses, il apparaît que sa mise en place est associée avec un shift anabolique vers la production de sérine puis de ses dérivés. Il conviendra de vérifier cette hypothèse sur un plus grand nombre de modèles. Le transfert de ces connaissances vers le développement d'approches thérapeutiques posera la question des enzymes à cibler (ETF ? / Antioxydants / Pro-oxydants) et de l'effet synergique d'un blocage du système OXPHOS et de la voie de biosynthèse de la sérine (non-canonique) au niveau de SLC25A12 ou de PSAT1 ou autre.

2. Le profilage métabolo-bioénergétique

Les nombreux travaux récents sur le métabolisme tumoral montrent l'importance de cartographier les voies du métabolisme dans les tumeurs pour identifier des différences avec les tissus sains, qui peuvent alors servir de cibles pour des approches thérapeutiques. Par quelle méthode peut-on révéler au mieux ce remodelage et identifier des cibles ? Cette stratégie est-elle réalisable dans le contexte du bloc opératoire où des aides à la décision rapide doivent être apportées aux chirurgiens cancérologues ?

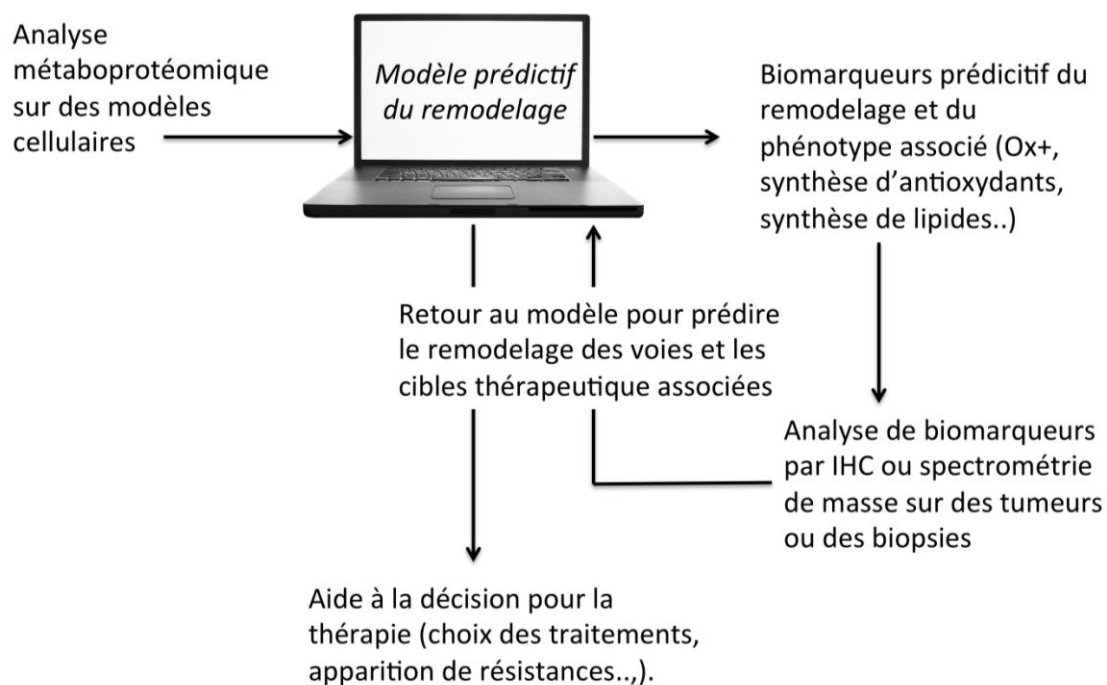
Notre approche a consisté en une analyse "métabo-protéomique" globale et quantitative pour mettre en évidence des circuits de remodelage, puis à vérifier la réalité de ces circuits par suivi de substrats marqués au C13 et au C14. L'invalidation de cibles par shRNA fournit alors une preuve de concept pour progresser vers l'identification de molécules pharmacologiques. Toutefois, cette approche est lente, notamment pour le traitement des données de protéomique et la reconstruction des voies remaniées. Idem pour l'analyse RMN, le traitement des pics, l'identification des espèces moléculaires et la quantification peuvent prendre du temps. Dans la partie 3, plus proche du défi qui attend les cliniciens et les chercheurs, l'analyse métabo-protéomique de pièces chirurgicales donne des informations importantes et suggère des biomarqueurs qui peuvent alors être étudiés sur un grand nombre d'échantillons (TMA par exemple). Les analyses de données transcriptomiques, donc du niveau d'expression de mRNA, sont apparues déconnectées des résultats de l'étude protéomique dans un article récent faisant le point sur le cancer du colon et du rectum (Zhang

et al., 2014). Pour cette raison nous apportons plus de poids aux données concernant le taux de protéines. Nous montrons toutefois qu'une signature protéomique se retrouve au niveau transcriptomique dans la partie sur les tumeurs de poumon.

Dans l'étude du métabolisme, des analyses bioinformatiques sont réalisées en soutien aux études expérimentales et des modèles mathématiques ont vu le jour, comme le "constraint-based modeling" qui est basé sur l'ensemble des contraintes auxquelles le métabolisme est soumis comme la concentration des métabolites, les contraintes thermodynamiques, et la contrainte des flux métabolique (Jerby and Rupp, 2012). Ce modèle GSMM peut incorporer des données transcriptomiques et protéomiques et fusionner différentes bases de données comme FVA (flux variability analysis), GIMME (Gene inactivity moderated by metabolism and expression) ou PRIME (personalized reconstruction of metabolic models) pour étudier les altérations métaboliques accompagnant la progression tumorale. Le logiciel Recon 2 (Thiele et al., 2013) cartographie le métabolisme en incluant 1789 enzymes (avec l'expression de leurs gènes respectifs), 7440 réactions métaboliques et 2626 métabolites répartis dans 8 compartiments cellulaires tout en tenant compte de la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique. L'analyse de nos données de protéomique comparative (tumeurs Ox+ et Ox-) par ce modèle pourrait nous aider à mieux cerner les changements qui s'opèrent à plusieurs niveaux du métabolisme. Il manque toutefois à ce modèle bioinformatique du métabolisme la capacité de relier les analyses expérimentales multi-niveaux (respiration, RMN, ATP..) obtenues sur des modèles et les données issues du "phénotypage" de tumeurs *ex situ* par protéomique. Cette stratégie pourrait, sur la base de la variation de marqueurs clefs à définir (protéines comme GDH, GOT1/2...) prédire les remaniements et surtout les objectifs biologiques associés, comme la synthèse de lipides ou de taurine. Dans ce cas, le modèle désignera un ou plusieurs biomarqueurs à mesurer pour constituer un faisceau d'arguments. Des approches pharmacologiques adaptées seraient alors envisagées. La question de l'hétérogénéité intra-tumorale se pose alors au plan bioénergétique, ainsi que le biais de l'échantillonnage car aucun modèle bioinformatique ne peut les prendre en compte. Plusieurs prélèvements doivent être réalisés dans des zones différentes de la tumeur et une décision pourrait être prise sur la base de la valeur moyenne issue de ces analyses.

L'autre option proposée par Deberadinis consiste à injecter un traceur enrichi en carbone 13 directement dans la tumeur du patient ou dans le sang, et de suivre par spectroscopie RMN, en imagerie, le devenir de ce traceur. Par cette méthode, il a montré que

l'injection de glucose conduit à la synthèse de glutamine par les glioblastomes. Les limites sont la résolution spatiale de la RMN et là encore, l'hétérogénéité de la tumeur (cf. partie 6). L'aspect temporel ou cinétique est aussi considérable, de même que les échanges entre les tissus qui peuvent compliquer les interprétations. Une analyse C13 réalisée *ex-situ* très rapidement pourrait être une alternative intéressante. Notre stratégie est résumée dans la figure ci-dessous.



3. La biosynthèse de la sérine

Cette thèse ne se destinait pas à l'étude de la biosynthèse de la sérine, mais nous avons été forcés de constater l'importance de cet acide aminé dans le remodelage métabolique. Comme expliqué dans l'introduction, le métabolisme de la sérine est lié au métabolisme mono-carboné. Ce dernier permet la formation rapide de composés cellulaires ainsi qu'une régulation de la balance REDOX et la formation de donneurs de groupements méthyle important pour la méthylation. En effet, la sérine rentre dans la composition de nombreuses protéines, mais elle sert aussi à la biosynthèse de divers composés comme la glutathione, la cystéine, la glycine, ou la choline ainsi que pour la méthylation de l'ADN ou des protéines. Il semble ainsi logique que la biosynthèse et le devenir de la sérine soient fortement régulés dans le cancer. La voie

principale de synthèse de sérine est branchée sur la glycolyse et utilise le métabolite 3 phosphoglycérate comme précurseur. Ce métabolite peut aussi être généré par la néoglucogenèse, lorsque le glucose vient à manquer. La sérine peut aussi être produite à partir de la glycine (Cf. Introduction). Des travaux récents indiquent l'importance des enzymes de la biosynthèse de sérine comme biomarqueurs (PSAT1 ou PHGDH) du fait de leur surexpression dans de nombreux cancers (Kim et al., 2014b; Vié et al., 2008; Yang et al., 2014b). Un article récent montre que le knockdown de PSAT1 supprime la prolifération cellulaire par arrêt du cycle cellulaire en G1/S dans des cellules de cancer du poumon non à petites cellules. Les auteurs confirment ces données *in vivo* dans un modèle de xénogreffe où ils observent une réduction de la taille des tumeurs lorsque PSAT1 est réprimée. A l'inverse la surexpression de PSAT1 augmente la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo*. Ceci passe par l'activation des facteurs de transcription E2F activés par PSAT1 (via pRb) qui entraînent une activation du cycle cellulaire et donc à la prolifération tumorale (Yang et al., 2014b). Dans ma thèse (partie 2), le facteur E2F1 est surexprimé en aglycémie et ce facteur pourrait jouer un rôle dans la mise en place de la NCSS, notamment lors de la phase S. D'autres études montrent aussi que la déplétion de PSAT1 surprime la prolifération cellulaire dans des lignées de cancer du sein (Possemato et al., 2011b) et du colon (Vié et al., 2008). La PHGDH est également impliquée dans la croissance tumorale. Cependant un article vient de montrer que si le knockdown de PHGDH entraînait une réduction de la concentration de sérine et une réduction de la prolifération cellulaire *in vitro* dans une lignée de cancer du sein, le knockdown de PHGDH n'affecte pas la maintenance et la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffes *in vivo*. *In vivo*, le microenvironnement tumoral joue un rôle essentiel que l'on ne considère pas *in vitro* (Chen et al., 2013). Dans ce cas, la sérine pourrait être produite à partir de la glycine sans l'intervention de PHGDH.

Dans la partie 2 de la thèse (HeLa en aglycémie), la sérine est produite à partir de la glutamine et du pyruvate. La voie NCSS'2' décrite dans la partie 2 se met alors en place, incluant la néoglucogenèse mitochondriale (PC et PCK2 et XXXX), la glutaminolyse (GLS et GLUD1) et la partie terminale de la biosynthèse de sérine (PHGDH, PSAT1...). Inversement, dans la partie 1 (HRAS), si la glutamine produit la sérine (voie 'NCSS1'), la voie utilisée est différente et requiert la carboxylation réductive ce qui explique le marquage sur le carbone 3 de la sérine à partir du carbone 2 de la glutamine. Cette voie utilise aussi l'ATP-citrate lyase (ACLY). Toutefois, comme la sérine est utilisée pour de nombreuses voies de synthèse, nous n'observons qu'une faible accumulation de sérine, alors que ses dérivés sont fortement

détectés par RMN du carbone 13, comme la cystéine et la choline, ou par RMN du proton, la taurine. L'activation de HRAS_{G12V} stimule ainsi un circuit d'anabolisme aboutissant à la production de phosphatidylcholine et de taurine alors que l'aglycémie stimule la transformation de glutamine en cystéine via la sérine.

Plusieurs questions se posent-à présent: quel est le rôle de ces composés (cystéine, taurine, sérine) dans la biologie des cellules cancéreuses ? Ces biosynthèses sont-elles vitales pour les cellules HRAS et peut-on identifier des approches thérapeutiques à ce niveau ?

Comme mentionné dans l'introduction je n'ai pas développé l'étude du stress oxydant dans nos modèles, notamment car une post-doc réalise ces études au laboratoire et exploite ce versant du modèle d'aglycémie. Toutefois, il convient de discuter nos résultats de manière succincte. Les cellules HRAS révèlent une augmentation des défenses antioxydantes dans l'analyse protéomique (SOD, catalase, GSH, taurine..), suggérant une situation de stress oxydant associée à cette mutation. Cela fut montré par d'autres auteurs (Irani, 1997; Kopnin et al., 2007; Rimessi et al., 2014). La surexpression de RAS augmente la concentration des ROS alors que l'expression de RAS à des niveaux physiologiques permet de réduire le taux de ROS (DeNicola et al., 2011). Le rôle des ROS comme messagers secondaires a été suggéré dans de nombreux processus comme le cycle cellulaire ou l'apoptose. Les ROS stimulent de nombreuses voies de signalisation comme AKT, MAPK, Ras-Raf-MEK-ERK, HIF, NADPH oxydases, PKC....(Wang et al., 2010). Les ROS sont également impliqués dans l'invasion métastatique. En effet, HRAS (et non NRAS) active MMP-2 (metallo-protéinase dégradant le collagène IV, principal constituant de la membrane basale) ce qui permet une invasion cellulaire (cellules épithéliales de cancer du sein) (MOON et al., 2000; Porporato et al., 2014b). Les ROS sont aussi décrits comme des activateurs des MMPs (Wang et al., 2010). Dans ce cas, est-ce que les ROS ne seraient pas les activateurs directs de MMP2 permettant l'invasion cellulaire en présence de HRAS muté?

Il apparaît énergétiquement parlant assez absurde de produire des ROS pour activer la prolifération des cellules cancéreuses (comme proposé par Weinberg (Weinberg et al., 2010)) mais en même temps de vouloir diminuer la concentration de ces ROS en produisant des défenses antioxydantes. Peut-être qu'il est difficile pour la cellule d'ajuster la production de ROS au niveau de la synthèse, et qu'il est plus facile de moduler leur concentration après coup, par l'ajustement des défenses antioxydantes. Nous pouvons aussi imaginer que l'augmentation des ROS dû à HRAS provient dans les phases initiales de la carcinogenèse,

permettant une prolifération tumorale. Secondairement, l'augmentation du taux de ROS est suivi par une augmentation des défenses oxydantes afin d'éviter la mort cellulaire due à une dégradation trop importante de la cellule (dommage à l'ADN...).

Une étude récente a montré que des cellules surexprimant HRAS_{G12V} présentent une augmentation de la concentration des ROS qui oxydent la phosphatase PTP1B, laquelle se retrouvant inactive ne peut pas déphosphoryler AGO2 qui active alors le processus de sénescence (Yang et al., 2014a) faisant de PTP1B une cible thérapeutique potentielle. La régulation des ROS est un processus complexe qui faudra étudier plus en détail dans notre projet (étude en cours). La taurine (qui est synthétisée à partir de la glutamine en présence de HRAS_{G12V}) est décrite comme un puissant antioxydant. La taurine est également un biomarqueur de l'apoptose dans les gliomes (Opstad et al., 2009) mais aussi un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein. Nous pensons que la taurine est produite pour assurer la survie des cellules où HRAS est muté. La surproduction de ROS reste à clarifier, notamment son origine et ses effets. La choline sert à synthétiser la phosphatidylcholine, un phospholipide majeur. Dans un contexte d'anabolisme et de stress oxydant, il apparaît cohérent de renouveler les lipides membranaires, souvent cibles des ROS.

Une étude sur des cellules de pancréas publiée dans Nature par le groupe de Lewis Cantley (Son et al., 2013) a montré que KRAS active GOT1 et permet la consommation non-canonique de glutamine. Dans cette étude, l'oxaloacétate produit à partir du glutamate sert à la synthèse malate puis de pyruvate par l'enzyme malique, qui produit alors du NADPH. La finalité proposée pour la glutaminolyse non-canonique est donc le pyruvate et le NADPH. Dans cette étude, le KO de la GOT1 est sauvé par l'ajout d' α -cétoglutarate et de malate qui alimentent *a priori* le cycle de Krebs. Le devenir de ces métabolites n'est pas véritablement connu, car ils pourraient être directement utilisés dans le cytosol sans nécessairement alimenter le cycle de Krebs. Nos données montrent que la glutamine sert aussi à la biosynthèse de phosphatidylcholine (PC) et de taurine. De plus, nous n'observons pas de pyruvate marqué à partir de la glutamine comme proposé dans le modèle de Son et al. où l'enzyme malique joue un rôle majeur (Son et al., 2013). Nous pouvons en déduire que la mutation KRAS pourrait exercer un effet métabolique différent de celui de HRAS, mais aussi que les cellules utilisées dans l'étude sur KRAS comportent d'autres mutations (LKB1, P53..) qui peuvent interférer avec les données. Néanmoins, nous pensons que les deux études aboutissent à une amélioration des défenses antioxydantes, et que cet aspect est lié à RAS

(HRAS et KRAS), le stress oxydant, apparaît comme une constante dans de nombreuses études.

Nos résultats montrent aussi que HRAS_{G12V} inhibe la voie canonique de la glutaminolyse en réduisant la quantité de GDH. Cet effet renforce le 'switch' vers la voie non-canonique, et les déterminants moléculaires demeurent incompris au niveau génétique. Des études ont révélé que l'enzyme GDH est sous le contrôle négatif de la Sirtuine 4 et son rôle pourrait être évalué dans notre étude.

De même, l'effet de C-MYC dans la signalisation HRAS-AMPK-glutaminolyse non-canonique semble important car nous observons que HRAS active l'expression de C-MYC et que le siRNA contre C-MYC est létal pour les cellules HRAS. Un lien étroit existe déjà entre MYC et le métabolisme de la glutamine, et son implication dans la carboxylation réductive a déjà été démontré (Wise et al., 2008). A notre connaissance, nos données sont les premières à montrer un lien entre HRAS et la biosynthèse de cystéine et de taurine à partir de glutamine. Une étude dans le mélanome a montré que l'activation de BRAF_{V600E} inhibe LKB1 en induisant sa phosphorylation dépendante de ERK1/2 à deux niveaux. Nous n'avons pas pu vérifier l'hypothèse selon laquelle HRAS activé stimule BRAF qui inhibe alors LKB1 par ce mécanisme, car les anticorps ne sont pas disponibles. Nous constatons cependant une augmentation de BRAF et de ERK1 avec une diminution de LKB1 lorsque HRAS est muté.

Nous avons choisi d'étudier HRAS dans un contexte pré-cancéreux, pour se rapprocher de la tumorigénèse naturelle où l'activation d'oncogène et l'inactivation de suppresseurs de tumeurs surviennent séquentiellement. Dans le "background" p53-pRb inactivés, ou le background "p53-pRb inactivés avec Small T activé", HRAS_{G12V} exerce son effet de stimulation de la respiration. Nos données se rapprochent de l'étude sur KRAS mentionnée plus haut (Son et al. 2014) et d'une autre étude menée sur un modèle HRAS_{G12V} (Telang et al., 2007b), et contredisent les analyses qui suggèrent un effet strictement "glycolytique" de HRAS, voire un effet inhibiteur sur le complexe I (HK et al., 1991; Qil et al., 2010; Telang et al., 2006). L'observation de la compartimentation du pyruvate stimulée par HRAS est aussi originale et témoigne du remodelage métabolique opéré par cet oncogène. Nous observons ainsi une augmentation des enzymes de la glycolyse lorsque que HRAS est activé, en sus de l'augmentation des protéines OXPHOS. Toutefois, l'analyse par RMN révèle que le glucose est transformé en lactate, et que la glycolyse semble déconnectée des OXPHOS (compartimentation du pyruvate). Outre l'effet de remodelage de la glutaminolyse associé à la

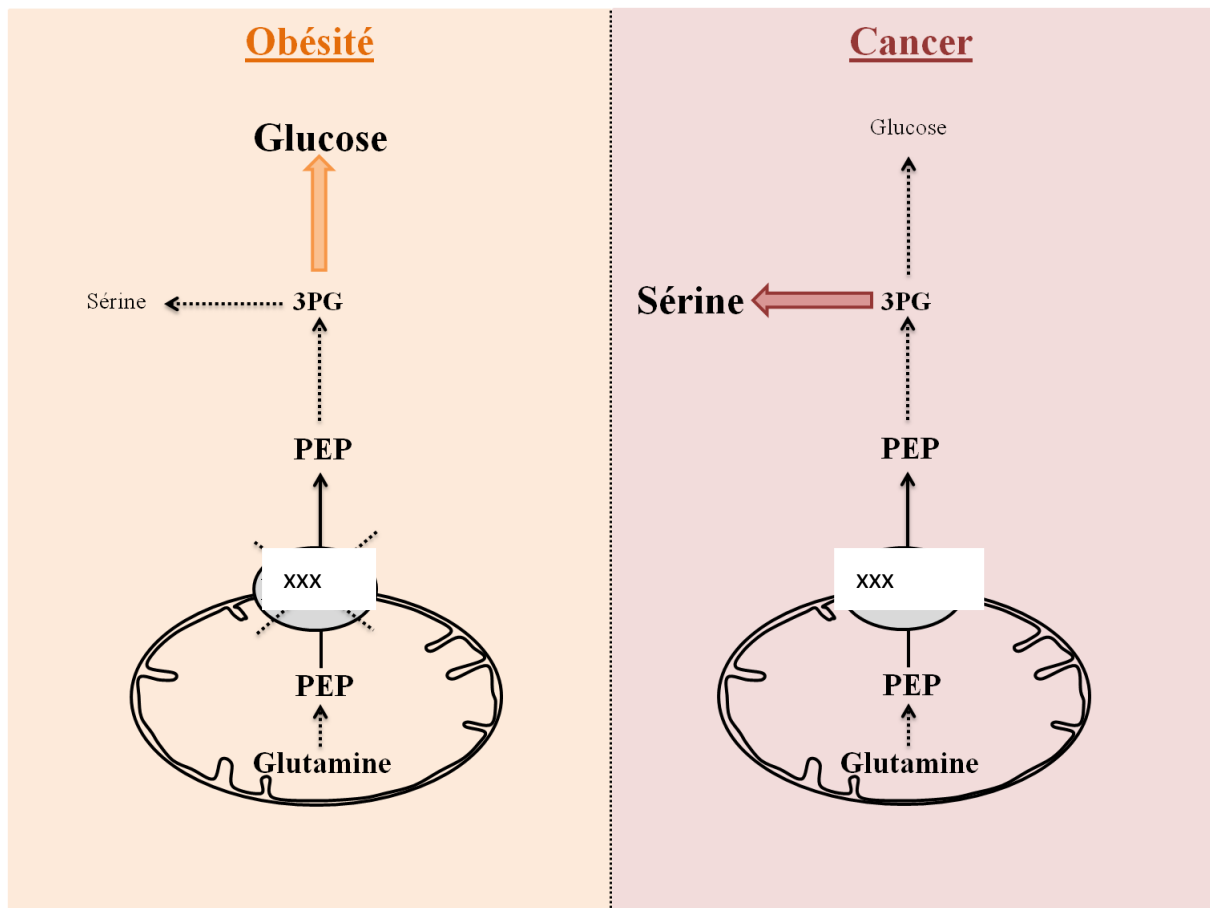
biosynthèse de taurine et de choline, nous observons une stimulation de la respiration mitochondriale. Plus précisément, la capacité maximale est augmentée (vitesse en condition découplée), indiquant une amélioration de l'efficacité des OXPHOS. Pourtant, il n'y a pas d'augmentation de la quantité de mitochondrie, ni de la biogenèse. La forte activité de la navette malate-aspartate pourrait suffire à alimenter la chaîne respiratoire en NADH, et l'augmentation des enzymes de la β -oxydation fournit du FADH₂. L'analyse par SeaHorse montre que HRAS active la consommation de nombreux substrats, comme le lactate ou l'hydroxybutyrate mais encore l'acétate. Ces observations révèlent la flexibilité métabolique conférée par HRAS qui permet de consommer un grand nombre de substrats. Nos données restent limitées à un modèle *in vitro*, et l'analyse de tumeurs HRAS par suivi de la glutamine pourrait confirmer nos résultats. Nous avons vu dans la partie 3 une situation mixte sur les tumeurs de poumon Ox⁺. Deux enzymes clefs de la glutaminolyse, GDH et GOT2 sont augmentées, en contradiction avec l'effet de HRAS qui active GOT2 mais inhibe GDH. La complexité des tumeurs de poumon rend leur analyse difficile mais proche de la réalité. La question reste posée pour d'autres mutations de HRAS (G12D, G12C/S, G13C/R, Q61K... (Kompier et al., 2010)), mais aussi pour l'activation de NRAS et de KRAS et plus généralement de la voie MAPK (via MEK...).

4. Le transporteur XXXX

Comme pour l'étude de la biosynthèse de la sérine, nous n'avons pas envisagé l'étude de la protéine XXXX ou encore appelé Mimp pour mitochondrial Carrier Homologue. La protéine XXXX de 33 kDa présente une homologie de séquence et de structure avec les "mitochondrial carrier proteins" et se localise dans la mitochondrie (Yerushalmi et al., 2002). Dans des cellules d'adénocarcinomes mammaires, la protéine XXXX est induite par la cytokine Met-hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) qui est un facteur mitogène, motogène et morphogène activant le récepteur à tyrosine kinase *c met* impliqué dans de nombreux cancers (Leibowitz-Amit et al., 2006). Le rôle de XXXX dans cette voie HGF/c-met reste à clarifier au vu de la fonction métabolique que nous avons identifiée. Dans des cellules cancéreuses de cancer gastrique (AGS) ou de colon (HCT116) la répression de XXXX est associée à un phénotype invasif (Yu et al., 2008). D'autres études ont montré XXXX comme un ligand de tBid, une molécule pro-apoptotique. Des MEFS-Ko conditionnel

XXXX^{-/-} présentent une diminution de la susceptibilité à l'apoptose induite par tBid par rapport aux cellules non transfectées (Katz et al., 2012; Zaltsman et al., 2010). La liaison des deux molécules déclenche l'apoptose. Les souris homozygotes KO XXXX^{-/-} montrent une létalité embryonnaire à 7.5 jours (Zaltsman et al., 2010) ce qui suggère un rôle important de XXXX dans le développement embryonnaire et peut-être dans la division cellulaire en accord avec nos observations.

Dans ma thèse, la découverte d'une voie non-canonique de biosynthèse de PEP puis de sérine à partir du pyruvate et du glutamate en situation d'aglycémie nécessitait l'export de PEP de la matrice mitochondriale vers le cytosol. Les livres de biochimie indiquent bien l'existence d'un tel transport de PEP, mais la protéine responsable demeurait inconnue. Nous avons émis l'hypothèse de l'activité de XXXX au vu de l'augmentation élevée (>200) de son expression en aglycémie, et nous avons sollicité la collaboration du Dr. Leonardo Pierri pour la validation expérimentale de cette possibilité. Lors de notre première discussion, le Dr. Pierri partageait l'idée que le XXXX devait transporter un ou des métabolites, à l'inverse des données publiées dans la littérature sur le rôle de XXXX, mentionnant une incapacité au transport (Robinson et al., 2012). Par une étude *in silico* de docking moléculaire nous avons tout d'abord observé la liaison possible du PEP au niveau de triplet 77, généralement impliqué dans le transport chez les autres transporteurs de cette famille. Les analyses de transport sur des liposomes ont confirmé notre hypothèse, et attestent de la fonction de XXXX comme transporteur de PEP en échange contre du Pi. Ce même Pi sert alors pour la synthèse d'ATP. Cette découverte ouvre un champ d'investigation important dans le domaine du métabolisme énergétique, de l'obésité, du diabète et du cancer. En effet, XXXX est exprimé dans les adipocytes ; il est aussi lié à l'obésité par des analyses génétiques (genome wide association studies (GWASs)) effectuées sur des individus de BMI élevé (Bauer et al., 2009; Kulyté et al., 2011b). Dans ce cas, des modifications du XXXX sont observées au plan génétique, mais son activité n'a pas été évaluée. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un gain de fonction du XXXX induirait une production accrue de glucose et l'hyperglycémie entrainerait l'obésité. Cela reste à démontrer. Le rôle de XXXX dans le cancer (ma thèse) et l'obésité (hypothèse) et résumé dans la figure ci-dessous :



5. Les modifications génétiques lors du remodelage métabolique

Le remodelage métabolique observé dans la partie 1 (HRAS) s'explique en grande partie par une inhibition de l'AMPK par HRASG12V. Il s'agit ici d'une régulation transcriptionnelle, et nous avons observé la modification de l'expression de nombreux messagers par qPCR. Toutefois, la partie 2 de ma thèse suggère des modifications au niveau de l'épissage des ARNm. La voie de biosynthèse de sérine non-canonique observée nous a conduit à effectuer un rapprochement avec des études réalisées sur une bactérie utilisée en biotechnologie pour de nombreuses synthèses, *Corynebacterium Glutamicum*. Cette bactérie présente un "acetate stimulon", c'est à dire un groupe de gènes activés par l'acétate. Ce groupe inclut la pyruvate carboxylase, la PEPCK, la SDH, l'enzyme malique et la PDH, qui sont toutes sans exception surexprimées en aglycémie. De plus, ce "stimulon acetate" est activé par le facteur de régulation sucR, et une analyse dans BLAST montre son homologie avec une protéine humaine nommée 'serine-rich splicing factor' (SRSF) qui existe sous plusieurs isoformes. De manière intéressante, ce facteur d'épissage est fortement augmenté en aglycémie comme indiqué par l'étude protéomique, surtout pour l'isoforme 2 (facteur 39000).

Les isoformes 1 et 3 sont plus modestement surexprimés (<10). Au moment de la rédaction de cette thèse, nous n'avons pas encore vérifié cette hypothèse selon laquelle SRSF2 régule la biosynthèse non-canonique de sérine et plus généralement le remodelage métabolique en aglycémie. Ce travail est en cours. L'analyse protéomique révèle aussi la surexpression de 3 facteurs intervenants dans le spliceosome, ce qui nous conduira à étudier cet aspect dans le remodelage métabolique cancéreux.

Par ailleurs, de nombreux oncogènes sont dérégulés par modification de leur état de méthylation au niveau chromatinien, et des changements épigénétiques pourraient aussi intervenir dans le remodelage métabolique. En particulier, la partie 2 montre des changements dans l'expression d'enzymes liées à la méthylation de l'ADN. La sérine sert normalement à réaliser la méthylation via son rôle de donneur de groupement méthyl. Dans une situation de manque de sérine, ce rôle pourrait être réduit pour préserver d'autres fonctions vitales comme la synthèse d'antioxydants tels que la glutathione ou la taurine. L'étude de cette hypothèse est en cours dans les cellules HeLa en aglycémie et n'a pas pu être complétée au moment du dépôt de la thèse.

6. L'appariement bioénergétique

La troisième partie de cette thèse révèle une association entre le caractère bioénergétique du tissu cancéreux et celui du tissu sain adjacent. A ce jour, aucune donnée de ce type n'a été produite sur du tissu humain. Pour chaque tumeur oxydative le tissu sain présente un phénotype glycolytique, et inversement. Nos observations sont issues de l'analyse de la respiration couplée à l'étude protéomique et nous proposons le terme de "métabo-protéomique" pour qualifier ce genre d'étude.

Les travaux de recherche du groupe de Pierre Sonveaux ont montré le couplage entre les cellules cancéreuses au sein d'une tumeur (Dhup et al., 2012a). Le groupe de Michael Lisanti a quant à lui proposé le concept d'effet Warburg inverse où la cellule cancéreuse dialogue avec le stroma sur le plan métabolique. Plus précisément, la cellule cancéreuse induit l'autophagie du stroma pour récupérer des acides gras, acides aminés et corps cétoniques pour effectuer la respiration, ce qui sous-tend un caractère oxydatif (Pavlidis et al., 2012). Lisanti montre également que la transformation oncogénique opérée par HRAS_{G12V} augmente la

quantité de ROS. Les cellules cancéreuses sont considérées comme "un parasite métabolique" pour le microenvironnement, l'obligeant à se remodeler de façon à favoriser la croissance. Lisanti propose que ce dialogue s'opère par les ROS et l'inflammation. Dans un article récent, M. Lisanti intègre sa théorie avec celle de P. Sonveaux en expliquant que les cellules cancéreuses oxydatives "MCT1" obligeraient (par l'intermédiaire des ROS) le microenvironnement à devenir glycolytique et positif pour MCT4 (Martinez-outschoorn et al., 2013). Juste après l'excision tumorale, l'anatomopathologiste partenaire de notre projet a découpé la tumeur en 3 régions histologiquement différentes: le centre de la tumeur, la zone cancéreuse active et le tissu sain adjacent. Lors d'une exérèse, voire d'une lobectomie, il est nécessaire de retirer une zone saine autour de la tumeur (appelée marge de sécurité) dont la taille varie en fonction de la nature tumorale (jusqu'à plusieurs cm). Toutefois, nous pouvons questionner ici le caractère sain de ce tissu au regard de son appariement bioénergétique opposé avec la zone tumorale. Selon le chirurgien impliqué dans notre travail, le tissu sain est pris à distance de la tumeur, et pas à sa frontière. De plus l'anatomopathologie confirme le statut sain de ce tissu en histologie. Toutefois, nous n'avions pas prévu d'analyser du tissu sain pris à grande distance, si bien qu'il est difficile de conclure sur à une possible modification des propriétés cellulaires du tissu sain (stade pré-cancéreux ?). Une analyse mutationnelle serait intéressante.

Nos données montrent qu'un groupe de tumeurs présente une respiration élevée, dans un milieu similaire à celui utilisé pour les tumeurs Ox⁻. Il s'agit de milieu de culture contenant de nombreux nutriments, comme le glucose, la glutamine, les acides gras ou de nombreux autres acides aminés. Les différences de respiration ne s'expliquent donc pas par le microenvironnement, mais plutôt par des caractéristiques du tissu cancéreux analysé. L'analyse protéomique différentielle a révélé ces différences, avec l'augmentation d'enzymes du métabolisme de la glutamine (GLSK x6.86, GOT2 x 7), du cycle de Krebs (OGDH x 6.7, MDH2 x 2.5) et du système OXPHOS (ATP_G x 2.4, ATP5F1 x 7.28). Nous n'avons pas pu effectuer des analyses d'inactivation de gènes sur ces modèles de tumeurs excisées, bien que des approches pharmacologiques sont réalisables. Elles seront réalisées ultérieurement.

Le concept d'effet Warburg inverse proposé par M. Lisanti ne peut pas expliquer l'ensemble de nos observations, notamment celles où l'on observe un tissu sain plus oxydatif que la tumeur (Ox⁻/Ht⁺). Nous préférons avancer l'hypothèse de "non-competitive tumor metabolism (NCTM)" pour désigner la possibilité que les cellules cancéreuses adoptent un métabolisme opposé à celui du tissu sain adjacent, en majorité volumique, de manière à éviter

la compétition. Cette vision Darwinienne d'une sélection bioénergétique présente un double avantage : l'absence de compétition mais aussi la symbiose métabolique (entre tissu sain et cancéreux, et non pas entre deux types de tissus cancéreux comme proposé par P. Sonveaux). Pour vérifier cette idée de métabolisme cancéreux non-compétitif nous avons étudié des cellules cancéreuses et non-cancéreuses en co-culture, et nous avons observé un shift du métabolisme cancéreux de Ox+ vers Ox-, aboutissant à un appariement de type tumeur Ox-. L'analyse des données cliniques montrent que les tumeurs Ox+ correspondent plutôt à des patients fumeurs, et que les tumeurs Ox- présentent un SUV max plus élevé comme classiquement observé sur les tumeurs à forte captation de glucose (de type Warburg). Il est intéressant aussi de noter que la taille des tumeurs Ox+ est plus élevée, indiquant une croissance très active et un anabolisme soutenu. Comme proposé plus haut, le caractère Ox+ pourrait être associé à une activité anabolique intense, avec des remodelages métaboliques comme la glutaminolyse biosynthétique. De manière intéressante, la partie sur HRAS associe un métabolisme oxydatif, une augmentation des défenses antioxydantes, des colonies plus grosses et de l'anabolisme à partir de la glutamine. Les tumeurs de poumon Ox+ présentent les mêmes caractéristiques, ce qui nous permet de proposer un phénotype « Ox+ » qui diffère du phénotype « Warburg » à plusieurs niveaux, comme résumé dans le tableau ci-dessous :

| <i>Phénotype</i> | WARBURG | Ox+ |
|---|----------------|------------|
| Respiration | ↘ | ↗ |
| SUV max | ↗ | ↘ |
| Taille de la tumeur | → | ↗ |
| Anabolisme | → | ↗ |
| Addiction à la sérine, la glutamine et la choline | ? | ↗ |
| Défenses antioxydantes | → | ↗ |

7. La thérapie bioénergétique du cancer

Ma thèse a permis de tester des approches précliniques, certes très limitées, mais originales, sur des modèles cellulaires. Dans les cellules HRAS, nous montrons que le blocage de SLC25A12 à l'aide de esiRNA et d'une drogue (le diethylpyrocarbonate, DEPC) tue spécifiquement ces cellules (aucun effet sur les cellules contrôles ou sur des cellules HeLa en aglycémie par exemple). Ceci fait de SLC25A12 une cible thérapeutique considérable. Ce transporteur est en plus surexprimé dans les leucémies myéloïdes aigues. L'inhibition de SLC25A12 pourrait bloquer la synthèse de sérine. Une analyse plus poussée des inhibiteurs du SLC25A12 a été menée par le Dr. Pierri *in silico* dans le cadre de notre collaboration. Le SLC25A12 est surexprimée dans une majorité de cancer comme la vessie, les lymphomes, le cancer du sein. Il est également surexprimé dans des tumeurs qui sont mutées au niveau de BRAF en V600E (données Oncomine). Nous allons ainsi tester des analogues du DEPC plus spécifique du SLC25A12. Dans la partie "aglycémie", le blocage de XXXX par esiRNA suffit à tuer les cellules, et nous pouvons les sauver avec de la sérine ajoutée dans le milieu. L'inhibition d'autres éléments de la voie NCSS est en cours d'analyse, de même que l'effet d'une répression des régulateurs génétiques comme SRSF1-6.

Dans la troisième partie, les données obtenues sur les tumeurs oxydatives indiquent des cibles potentielles. Cependant il y a beaucoup de difficultés à contourner dans les modèles *in vivo*. Tout d'abord il y a le problème de l'hétérogénéité retrouvée à plusieurs niveaux. Au niveau intratumoral pour commencer. En effet, au sein d'une même tumeur peut y avoir une ou plusieurs mutations (oncogène, suppresseur de tumeur...). Ceci peut amener une résistance au traitement ciblant "la mutation principale". Au niveau métastatique également, il peut y avoir une hétérogénéité intra métastatique où les métastases acquièrent des mutations différentes de celles de la cellule-mère. Il y a aussi l'hétérogénéité inter-métastatique au sein d'un même patient, cela peut être du à la mutation de gènes 'passengers' différents. Le problème majeur d'hétérogénéité provient de la différence entre les patients car elle entraîne l'utilisation de thérapies combinées ciblant plusieurs voies au sein d'une même tumeur (Cf. Chapitre VI.3).

La théorie de M. Lisanti de considérer les cellules cancéreuses comme des "parasites métaboliques" suggérerait une nouvelle manière de traiter le cancer: comme une maladie infectieuse à l'aide d'antibiotiques (Martinez-outschoorn et al., 2013). La doxycycline inhibe

le cancer du sein métastatique de 70% en étude pré-clinique sur des modèles *in vitro* (lignée MDA-MB-231) et *in vivo* (souris) (Duivenvoorden et al., 2002). Cette approche reste toutefois à clarifier.

La résistance aux traitements de chimiothérapie reste le problème majeur dans le traitement du cancer, et la thérapie bioénergétique, ou métabolique, risque aussi d'être limitée par ce phénomène. Si la flexibilité métabolique permet de révéler des cibles pour le traitement du cancer, elle pourrait aussi poser les bases de la résistance à ces traitements. Mais cela reste une supposition, car le traitement de la leucémie par l'arginase fonctionne très bien (Morrow et al., 2013; Mussai et al., 2013; Tanios et al., 2013) ainsi que celui avec l'asparaginase (Angiolillo et al., 2014). Dans ce cas, le cancer a développé une addiction à l'arginine, et la consommation de ce substrat par une enzyme exogène limite la croissance tumorale, sans trop impacter les tissus environnants. La réussite dans la thérapie métabolique reposerait peut-être dans l'évaluation de ces "addictions" et la limitation de l'apport en ces éléments cruciaux pour la croissance tumorale. Il s'agit de la glutamine, de la sérine, de l'arginine et de bien d'autres éléments à découvrir. Nos travaux montrent que la choline est un élément important à considérer. Le développement d'un modèle bioinformatique du remodelage métabolique serait un apport indéniable à notre stratégie de ciblage.

Des études de limitation de substrats comme le glucose (partie 2 de cette thèse) ou la glutamine (Byun et al., 2014; Mathews et al., 2014) montrent que les cellules cancéreuses développent des stratégies de contournement, pour arriver à produire les éléments essentiels à leur croissance. Nous observons qu'en aglycémie les cellules HeLa produisent la sérine à partir de la glutamine en empruntant le transporteur de phosphoenolpyruvate XXXX et la voie NCSS. Ainsi, en aglycémie, le remodelage métabolique permet la survie de la cellule cancéreuse. Nos travaux sont donc importants car ils décrivent des moyens de survie et révèlent des cibles. Par exemple, le ciblage de XXXX serait intéressant lorsque les cellules seront placées en aglycémie, soit naturellement, soit pharmacologiquement. Ces approches ne sont pas encore existantes, et la toxicité risque d'être élevée, la fenêtre thérapeutique étroite et le risque de résistance considérable. Toutefois, nous devons progresser dans la recherche de cibles métaboliques, et des combinaisons de radiothérapie et de chimiothérapie ciblée, bioénergétique ou métabolique, devront être testées.

La partie 2 de cette thèse sur l'aglycémie soulève aussi des questions sur la reprogrammation génétique au cours du remodelage métabolique. En aglycémie, plusieurs

enzymes impliquées dans la méthylation de l'ADN sont réprimées, et le substrat utilisé pour la méthylation (5,10 tétrahydrofolate) est redirigé vers la synthèse de sérine, tout du moins sur le plan des voies métaboliques. Dans ce cas, des modifications de l'état de méthylation sont à prévoir, si bien que les cellules cancéreuses remodelées sur le plan bioénergétique pour survivre en aglycémie pourraient présenter un épigénome différent des cellules avant confrontation à l'aglycémie. Cette analyse épigénétique avant et après aglycémie est en cours au laboratoire car elle pourrait présenter les bases de thérapies ciblées sur le métabolisme du glucose.

Il existe un grand nombre de cibles actuellement considérées pour la thérapie métabolique : HK2, PDK1, PSAT1, PHGDH, GLS, GOT1, CI, F_1F_0 -ATPsynthase... et certains composés ont dépassé le stade préclinique. Lorsque nous disposerons de suffisamment d'outils pharmacologiques nous pourrions proposer des combinaisons adaptées au métabolisme des tumeurs et aux mécanismes de résistance par remodelage que nous aurons anticipé. Comme indiqué dans le point précédent, la considération du dialogue métabolique entre le tissu cancéreux et le tissu "sain" environnant pourrait permettre de proposer des stratégies thérapeutiques à ce niveau. Il va falloir identifier les molécules impliquées dans le dialogue métabolique, et comme observé sur notre modèle cellulaire de co-culture, nous devons comprendre les bases moléculaires responsables de l'adaptation appariée du profil métabolique. Les tumeurs Ox+ sont associées à du tissu sain Ox-. Est-ce le résultat d'un remodelage, ou était-ce ainsi à l'origine du cancer ? En effet, peut-on proposer que les tissus plutôt glycolytiques donnant des tumeurs Ox + ? Ou est-ce que une tumeur Ox+ entraîne un shift glycolytique du tissu adjacent?

Nous proposons ici que le cancer choisit un mode bioénergétique qui n'entre pas ou peu en compétition avec le tissu environnant, de manière à tirer profit d'un maximum de ressources. Ce concept de "non-competitive metabolism" serait déterminé par les substrats disponibles par exemple. Le lien avec l'oncogénétique, base des thérapies dites "ciblées" actuelles avec le profil métabolique des tumeurs reste à clarifier. Est-ce que toutes les tumeurs KRAS sont addictes à la glutamine ? Que se passe-t-il sur ce profil lorsque p53 est muté ?

La biologie des systèmes et la bioinformatique vont être des alliés importants dans la recherche de thérapies métaboliques ciblées, tout en considérant l'aspect génétique qui permettra de moduler le profil alors prédit sur la base de biomarqueurs.

PERSPECTIVES

De nombreux points restent à clarifier dans les études détaillées dans ma thèse, et de nouvelles questions se posent à l'issue de mon travail. J'ai résumé ici les directions qui seront suivies par le laboratoire concernant les trois parties de ma thèse.

1/ Etude du remodelage métabolique activé par HRAS

- Nous étudierons en détail l'origine des ROS (rôle des NOX et de l'ETF ; chaîne respiratoire ?) et l'effet de stratégie pro ou antioxydantes. La peroxydation des lipides sera évaluée et le rôle anti-oxydant et protecteur de membranes de la phosphocréatine sera mesuré.
- L'hypothèse d'une prénylation favorisant le métabolisme énergétique sera aussi testé sur le modèle HRAS
- Ils nous reste à étudier plus en détail le métabolisme de la cystéine et de la taurine par l'intermédiaire de esiRNA et d'inhibiteurs pharmacologiques (criblage ?) afin d'étudier l'impact sur la croissance tumorale et sur le métabolisme et plus particulièrement l'effet sur les ROS. Les cibles potentielles du métabolisme de la cystéine et de la taurine pourraient également être testées avec des molécules pro-oxydantes (imexon en test de phase 2 dans lymphome non-Hodgkin (Barr et al., 2014), DDT (dichlorodiphényltricholoéthane)...) ou antioxydante (Resveratrol, PEITC,...)
- Le mécanisme liant AMPK/CMYC/mTOR sera évalué en étudiant l'effet de BRAF.
- Comme expliqué précédemment, l'inhibition de SLC25A12 pourrait bloquer la synthèse de sérine. Nous allons procéder à des tests précliniques de molécules identifiés *in silico*.
- Le lien avec la migration cellulaire reste aussi à clarifier.

2/ Aglycémie

- Nous allons vérifier l'hypothèse d'un recyclage des acides gras plutôt qu'une synthèse de *novo* en réalisant leur hydrolyse puis une analyse par TLC et radioactivité.
- La localisation et la fonction de XXXX seront analysés au regard de son lien publié avec tBid
- La cristallisation de XXXX va être effectuée (en cours) pour disposer de la structure 3D nécessaire à un développement thérapeutique ultérieur.
- La régulation du métabolisme par épissage alternatif va être analysée.

3/ Tumeurs excisées :

- Nous allons renforcer la collaboration avec le service du Pr. Velly, notamment avec le chirurgien M. Thumerel et l'anatomopathologiste H. Begueret pour évaluer le lien Ox+/taille tumorale/SUV/type de cancer.
- Le statut mutationnel et fumeur du tissu HT+/HT- 'non-cancéreux' sera évalué.

- A travers la cellule de transfert CELLOMET que nous créons au sein de notre laboratoire et dont je serai l'animatrice, des outils de 'métabo-protéomique' vont être développés comme un programme bioinformatique du remodelage. L'analyse ciblée de biomarqueurs par protéomique va également être étudiée ainsi que le ciblage de nouveaux biomarqueurs.
- Nous avons proposé le concept de "non-competitive metabolism". De nouvelles thérapies pourraient voir le jour en ciblant le dialogue métabolique entre le tissu cancéreux et le tissu "sain" environnant. Pour cela, Il va falloir identifier les molécules impliquées dans ce dialogue, et comme observé sur notre modèle cellulaire de co-culture, nous devons comprendre les bases moléculaires responsables de l'adaptation appariée du profil métabolique. Ceci nécessitera de nouvelles expérimentations comme l'étude protéomique par co-culture d'un type cellulaire non-cancéreux en présence d'un type cellulaire cancéreux ou des expériences d'auxotrophie ainsi que des analyses en lien avec l'oncogénétique.

ANNEXES

1-MATERIELS ET METHODES

Milieu Glucose :

- Milieu GIBCO low glucose (Fisher, 31885-049)
- 10% de Sérum de veau fœtal
- 5mL Pénicilline-Streptomycine (Fisher, 15070063)
- 5 mL d'HEPES (Fisher, 15630080)

Milieu Galacose :

- Milieu GIBCO no glucose (Fisher, 11966-025)
- 10% de Sérum de veau fœtal
- 5 mL de Galactose à 1M (Sigma, G0625-500G)
- 5mL Pénicilline-Streptomycine (Fisher, 15070063)
- 5 mL d'HEPES (fisher, 15630080)
- 5 mL de sodium pyruvate à 100 mM (Fisher, 11360070)
- 5 mL de glutamine à 200 mM (Fisher, 25030081)

Extraction, dosage des protéines transmembranaires ou cytoplasmiques

Extraction

- A partir d'une T75, aspirer le milieu
- Rincer avec 10 mL de PBS 1X froid
- Aspirer le PBS
- Ajouter 2mL de trypsine → 5min à 37°C
- Ajouter 10 mL de PBS 1X froid
- Transférer le tout dans un Falcon de 15 mL
- Centrifuger 5 minutes à 2000 rpm à 20°C
- Aspirer le surnageant
- Congeler le culot cellulaire à -20°C ou effectuer l'extraction protéique de suite
- Pour 4 millions de cellules, reprendre le culot cellulaire avec 200 µL de RIPA et 1 µL d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases
- Transférer dans un eppendorf
- Mettre 5 minutes sur la glace
- Sonication : pulse 30 secondes/30secondes pendant 30min à 65° d'amplitude

Dosage (kit BCA Pierce- 23225)

→ Gamme de BSA (2 mg/mL)
+ 160 µL réactif A+B par puits

| BSA (µg) | 0 | 1 | 5 | 10 | 20 | 30 | 40 |
|--------------|----|------|------|----|----|----|----|
| BSA (µL) | 0 | 0.5 | 2.5 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| Tp RIPA (µL) | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| H2O qsp 40µL | 37 | 36.5 | 34.5 | 32 | 27 | 22 | 17 |

→ Echantillon à doser
3 µL d'échantillon, 37 µL d'H₂O, 160 µL de réactif A+B par puits

→ Réactif

1 volume de réactif B + 50 volumes de réactif A

$$(160 \cdot \text{nb puits}) / 51 = x \text{ µL réactif B}$$

$$x \cdot 50 = y \text{ µL réactif A}$$

- Faire la gamme en duplicat
- Les échantillons à doser en une fois

Préparation des échantillons

- Mettre 1 volume de tampon Laemmli 4X (Biorad 1610747) pour 4 volumes d'échantillon protéique
- Faire chauffer 15 min à 65°C

Electrophorèse

- Déposer chaque échantillon (20 µg de protéines) et le marqueur de taille (Bio-Rad 161-0374) sur des gels pré-castés TGX Stain Free Gels, 4-15% (Biorad 4568086)
- Laisser migrer 45min à 150 volts

Activation du gel aux UV

- 5 min d'exposition aux UV.

Transfert

- Turbo transfert biorad avec le RTA kit (biorad 1704271) sur une membrane de nitrocellulose
- Deux gels : transfert à 2.5 A, 25V et 7 min

Blocage de la membrane

- Incuber la membrane 60 min à température ambiante sous agitation dans du tampon de blocage odyssey (eurobio 927-40003)

Incubation avec l'anticorps primaire

- Incuber la membrane sur la nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps primaire dilué dans le tampon de blocage avec du tween.
- Le lendemain, rincer la membrane 5 minutes 3 fois avec du PBST sous agitation à température ambiante

Incubation avec l'anticorps secondaire

- Incuber la membrane 1 heure sous agitation à température ambiante avec l'anticorps secondaire dilué au 1/3000 dans du tampon de blocage.
- Rincer la membrane 5 minutes 3 fois avec du PBST sous agitation à température ambiante

Révélation à l'odyssey

Préparation des échantillons

- Ensemencement plaque 6 puits (100 000 cellules/puits)

Incubation esiRNA

- Dilution esiRNA à 20 ng/μl
- Chaque puits contient 150 pg esiRNA
- Dans un eppendorf, ajouter 7,5 μl esiRNA à 20 ng/μl, puis 1,25 μl OPTIDMEM (Fisher, 31985062), 1,25 μl de fugen (Promega, E2691).
- 15 min d'incubation à température ambiante
- Mélange 10μl de mix dans 2 mL de milieu

Incorporation BrDu

Préparation des échantillons:

- 300 000 cellules / flasques

Incorporation BrDU :

- Solution stock : 12 µl/100 µl DPBS
- Ajouter 25 µl de solution stock pour 1 mL de milieu
- Incubation 2h

Extraction cellulaire :

- Trypsiner les cellules
- Récupérer le culot cellulaire

Fixation-perméabilisation :

- Ajouter 100µl de cytofix/cytoperm
- Incubation 20min dans la glace
- Ajouter 500 µl de Wash buffer (dilution au 1X)
- Centrifugation 13 000 rpm pendant 5 min
- Jeter le surnageant
- Ajouter 100µl de cytoperm
- Incubation 10min dans la glace
- Ajouter 500 µl de Wash buffer (dilution au 1X)
- Centrifugation 13 000 rpm pendant 5 min
- Jeter le surnageant
- Ajouter 100µl de cytofix/cytoperm
- Incubation 50min dans la glace
- Ajouter 500 µl de Wash buffer (dilution au 1X)
- Centrifugation 13 000 rpm pendant 5 min
- Jeter le surnageant

Incubation DNase :

- Ajouter 100 µl de DNase (300µL de DNase/700µL DPBS)
- Incubation 1h à 37°C
- Ajouter 500µL de Wash Buffer
- Centrifugation 13 000 rpm pendant 5 min

Incubation anticorps :

- Ajouter 50µl de wash Buffer + 1µl d'anticorps anti-BrDu
- Incubation overnight à 4°C

2^e jour :

- Ajouter 1 mL de Wash Buffer
- Centrifugation 13 000 rpm pendant 5 min
- Jeter le surnageant
- Ajouter 20 µl de 7-AAD
- Incubation 20 min dans la glace

Lecture au cytomètre en flux

Préparation des échantillons

- Ensemencement de 500 000 cellules/ boîtes de pétri
- Incubation le lendemain pendant 48h avec les milieux glu ou gal

Incubation avec les substrats marqué au ^{13}C :

- Dans un milieu minimum, ajouter les substrats marqués et froids pendant 2h.

Extraction cellulaire :

- Récupération des milieux extracellulaires
- Rinçage rapide au PBS
- Ajout 4 mL d'acide perchlorique à 0.9M
- Grattage pour casser les cellules et récupérer les métabolites
- Centrifugation 5 min à 10 000g → séparation protéines (culots) et métabolites (surnageant)

pH des milieux :

- Les métabolites récupérés sont dans un milieu au pH acide → ajustement du pH à un pH 7,2
→ Formation de cristaux de sels
- Centrifugation 5 min à 4000g pour éliminer les cristaux
- Récupération du surnageant

Dosage des protéines :

- Dosage des protéines avec le kit BCA.

Quantification RMN

Extraction ADN

Kit quiagen :

- DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (69504)

Extraction :

- Culot cellulaire repris dans 200 µl de DPBS, avec 20 µl de protéinase K et 4 µl de RNase free A
- Incubation 2 min à température ambiante
- Ajout 200 µL de tampon AL 10 min à 56°C
- Ajout 200 µl ethanol absolu
- Mettre le tout dans une colonne
- 1 min à 10 000 rpm
- Vider le tube collecteur
- Ajout 500 µL de tampon AW1
- 1 min à 10 000 rpm
- Vider le tube collecteur
- Ajout 500 µL de tampon AW2
- 1 min à 10 000 rpm
- Changer le tube collecteur
- 2 min à 10 000 rpm
- Jeter le tube collecteur et ajouter un tube eppendorf sous la colonne
- Ajout 200 µl d'eau dans la colonne
- Incubation 1 min à température ambiante
- 1 min à 10 000 rpm
- Lecture avec le nanodrop

Kit quiagen

- RNeasy Mini Kit (74134)

Extraction :

- Reprendre les culots cellulaires dans 350 µl de tampon RLT
- Vortexer 30s
- Mettre le mix dans une colonne violette
- 15 s à 10 000 rpm
- Jeter le colonne et récupérer le mix du tube collecteur
- Ajouter 350 µL ethanol à 70%
- Mettre le mix dans une colonne rose
- 15 s à 10 000 rpm
- Vider le tube collecteur
- Ajouter 700 µl de tampon wash 1
- 15 s à 10 000 rpm
- Vider le tube collecteur
- Ajouter 500 µl de tampon RPE
- 15 s à 10 000 rpm
- Vider le tube collecteur
- Ajouter 500 µl de tampon RPE
- 2 min à 10 000 rpm
- Jeter le tube collecteur et ajouter un tube eppendorf sous la colonne
- Ajout 30 µl d'eau RNase free dans la colonne
- Incubation 1 min à température ambiante
- 1 min à 10 000 rpm
- Lecture avec le nanodrop

RT-qPCR

Préparation des échantillons

- Ensemencement des cellules dans des boîtes de petri

Extraction d'ARN :

- Grattage des boîtes
- Extraction ARN avec le kit quiagen

Reverse transcriptase :

- kit Biorad (170-8842)
- Préparation du mix :

| Composition | Volume par réaction |
|--|---------------------|
| 5x iScript advanced reaction mix | 4 µl |
| iScript advanced reverse transcriptase | 1µl |
| ARN | Variable |
| Eau | Variable |
| Volume total | 20 µl |

- 30 min à 42°C
- Arrêt de la RT : 5 min à 85°C

plaque qPCR :

- plaque custom Biorad
- 50 ng d'ARN

Cristal Violet

Cristal violet :

- Sigma C3886-25G
- Pesez g de poudre dans 250 mg dans 25 ml d'eau. Solution stock à 1%
- 2,5 ml de solution à 1% dans 50 mL d'eau → Working solution à 0,05% qu'il faut filtrer avec un filtre de 0,22 µm

Plaque 6 puits :

- Rincez les puits au PBS

Fixation :

- Ajoutez 1 mL de PFA à 4%
- Incuber 5 min sous agitation à température ambiante
- Enlever la PFA

Incubation cristal violet :

- 1 mL de cristal violet à 0,05%
- Incubation de 30 min sous agitation à température ambiante

Solubilisation :

- Rinçage avec de l'eau jusqu'à ce que l'eau devienne claire
- 5 mL ethanol absolue par puits
- Incubation de 5 min sous agitation à température ambiante

Révélation :

- Transférer 200µL de chaque puits dans une plaque 96 puits pour la lecture
- Lecture de la densité optique avec spectromètre SAFAS à 570nm.

Quantification ATP

Kit Roche : Cat. No. 11 699 709 001

Préparation des échantillons

- Ensemencement des cellules dans des flasques
- Trypsiner les cellules

Préparation de la plaques 96 puits :

- Division du culot cellulaire entre 50 000 et 200 000 cellules par puit dans un volume final de 50 uL (plaque 96 puits)
- Il faut compter un minimum de 12 puits par lignées et par conditions afin d'avoir 3 puits contrôles, 3 puits avec inhibiteur de la mitochondrie (rotenone, oligomycine ou antimycine) et 3 puits avec inhibiteur de la glycolyse (iodoacétate par exemple). Prévoir 6 puits pour la gamme d'ATP
- Ajout 5 ul d'une solution de rotenone à 5 uM dans 4 puits et 5 uL d'une solution de iodoacétate à 5 mM par puts dans 4 autres puits
- Incubation 10 min à 37°C
- Ajoutez 50µl de tampon de lyse par puits
- Ajouter 900 uL de tampon de dilution dans l'aliquot d'ATP 10 uM, soit une solution à 1 uM
- Faire la gamme d'ATP dans la plaque

| | | | | | | | |
|--|-------------------------|----|------|-----|------|-----|-------------|
| Ex. | EAU : 100 | 95 | 90 | 75 | 50 | 0 | } <u>uL</u> |
| | ATP 1 <u>uM</u> : 0 | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 | |
| Conversion en concentration d'ATP | | | | | | | |
| | [<u>umole/L</u>] : | 0 | 0.05 | 0.1 | 0.25 | 0.5 | 1 |
| | [<u>pmole/puit</u>] : | 0 | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 |

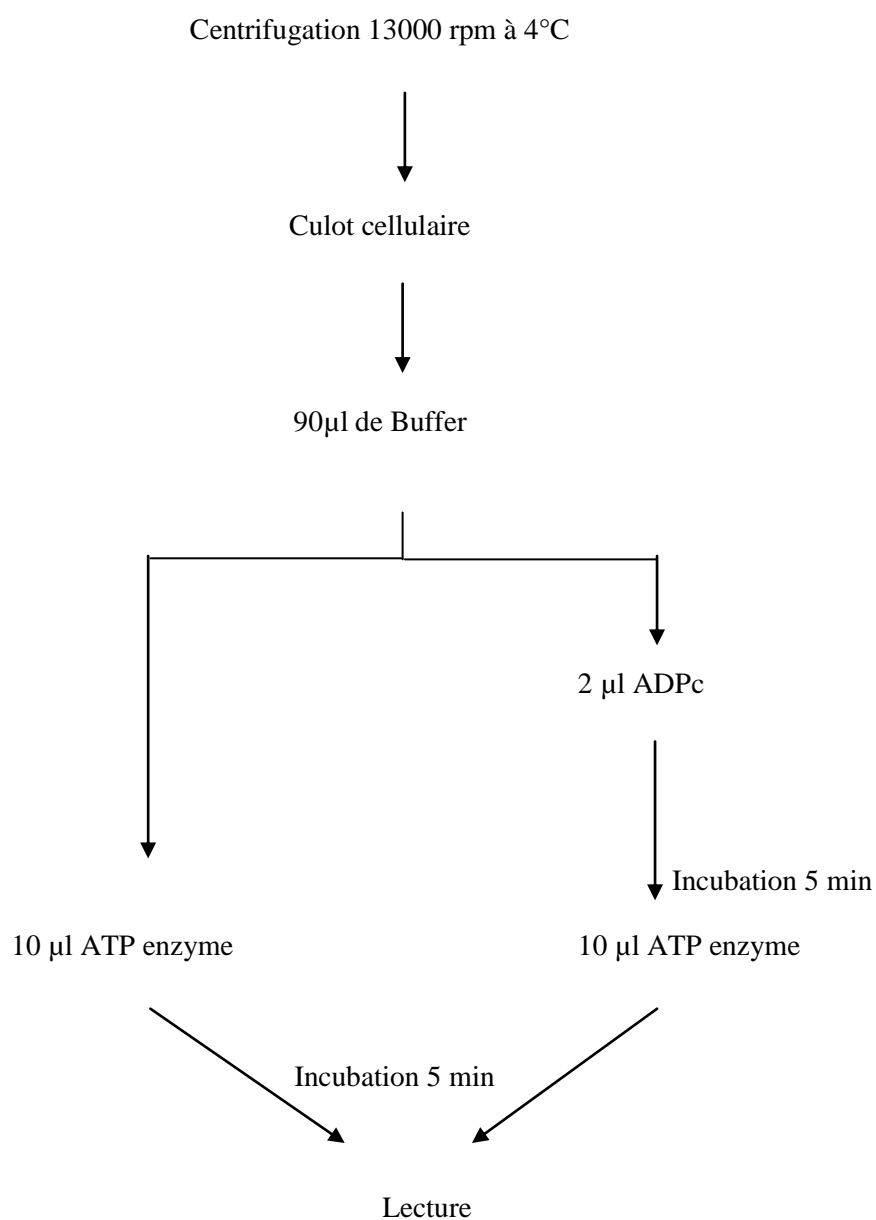
- Dilué la luciférase au 1/10e
- Ajout de 100µl de luciférase par puits (réalisé par le luminoscan)
- Lecture au luminoscan

Quantification ratio ATP/ADP

Kit abcam: ab 65313

Préparation des échantillons

- Ensemencement des cellules dans des boîtes de petri
- Trypsiner les cellules
- Division du culot cellulaire en deux



- Lecture au luminoscan

Respiration

Calibration OROBOROS

- Cliquer sur LAYOUT --> 1-Claibration
- mettre 2 mL d'eau, rotation aimant , ajout des bouchon avec formation d'une bulle d'eau dans la chambre et attendre que le signal soit compris entre -0.5 et 0.5
- oxygraphe --> calibration --> O1 entre -0.5 et 0.5 --> ok

Respiration :

- 1 millions de cellules par chambre
- LAYOUT --> 6- specific flux
- mesure respiration basale (x3)
- ajout oligomycine 2 μ l (concentration finale : 4 μ g/ μ l)
- mesure respiration (x2)
- ajout FCCP 2 μ l (concentration finale : 1 μ M)
- mesure respiration (x3)
- Ajout roténone + antimycine

2-LISTE DES PUBLICATIONS ET
DES COMMUNICATIONS
ORALES

1) EMERGING CONCEPTS IN BIOENERGETICS AND CANCER RESEARCH: METABOLIC - FLEXIBILITY, COUPLING, SYMBIOSIS, SWITCH, REMODELING, SIGNALING AND THERAPY.

Emilie OBRE and Rodrigue ROSSIGNOL. International Journal of Biochemistry and Cell Biology. Review (accepted in press).

2) HRASG12V ACTIVATES NON-CANONICAL SERINE BIOSYNTHESIS.

Jose C.^{1§}, **Obre E.**^{1§}, Durrieu S.², Redonnet-Vernhet I.¹, Guillaume Bouyssou³, Hébert-Chatelain E.¹, Ayyasamy V.⁴, Claverol S.⁵, Bonneau M.⁵, Lacombe D.¹, Imasawa T.¹, Singh K.K.⁴, Pierri C.L.⁶, Moreau P.³, Teichmann M.^{2#}, Bouzier-Sore AK.^{7#}, and Rossignol R.^{1*}. Article soumis à PNAS. E. Obre co-premier auteur.

3) METABOPROTEOMIC CHARACTERIZATION OF HUMAN LUNG TUMORS EVIDENCES TWO BIOENERGETIC SUBGROUPS

Obre E.¹, Bellance N.¹, Kieffer Y.², Furt F.³, Claverol S.⁴, Bonneau M.⁴, Lacombe D.¹, Bouzier-Sore AK.⁵, Moreau P.³, Velly JF.⁶, Baste JM.⁵, Mechta-Grigoriou F.^{2§}, Thumerel M.^{5§}, Bégueret H.^{5§}, and Rossignol R.^{1§}. Article en préparation (sera soumis en décembre à Cell Metabolism). E. Obre premier auteur

4) GLUCOSE DEPRIVATION REPARTERNS CANCER CELLS METABOLISM AND UNCOVERS THE FUNCTION OF XXXX IN PHOSPHOENOLPYRUVATE EXPORT FROM MITOCHONDRIA

E. Obre¹, N. Bellance^{1§}, Bari^{2§}, Bari^{2§}, Jose C.¹, Chatre L.³, Guillaume Bouyssou.⁴, Lavie J.¹, Claverol S.⁵, Bonneau M.⁵, Mahfouf W.⁶, Imasawa T.¹, Richetti M.³, Moreau P.⁴, Rezvani H.⁶, Pierri CL.^{2£}, Bouzier-Sore AK.^{7£} and Rossignol R.^{1§}. Article en préparation. E. Obre premier auteur

5) STEP-WISE BIOENERGETIC DIFFERENTIATION OF HUMAN GLOMERULAR PODOCYTES IS ABORTED BY HYPERGLYCEMIA

Toshiyuki Imasawa¹, **Emilie Obre**², Nadège Bellance², Julie Lavie², Tomoko Imasawa², C. Combe, Rigother C., Delmas Y., Didier Lacombe², Stephane Claverol³, Marc Bonneau³, and Rodrigue Rossignol². En préparation sera soumis en décembre. E. Obre deuxième auteur.

6) RHEB REGULATES MITOPHAGY INDUCED BY MITOCHONDRIAL ENERGETIC STATUS

Melser S, Chatelain EH, Lavie J, Mahfouf W, Jose C, **Obre E**, Goorden S, Priault M, Elgersma Y, Rezvani HR, Rossignol R, Bénard G. Cell Metab. 2013

7) ALTERATION OF FATTY-ACID-METABOLIZING ENZYMES AFFECTS MITOCHONDRIAL FORM AND FUNCTION IN HEREDITARY SPASTIC PARAPLEGIA

Tesson C, Nawara M, Salih MA, Rossignol R, Zaki MS, Al Balwi M, Schule R, Mignot C, **Obre E**, Bouhouche A, Santorelli FM, Durand CM, Oteyza AC, El-Hachimi KH, Al Drees A,

Bouslam N, Lamari F, Elmalik SA, Kabiraj MM, Seidahmed MZ, Esteves T, Gaussen M, Monin ML, Gyapay G, Lechner D, Gonzalez M, Depienne C, Mochel F, Lavie J, Schols L, Lacombe D, Yahyaoui M, Al Abdulkareem I, Zuchner S, Yamashita A, Benomar A, Goizet C, Durr A, Gleeson JG, Darios F, Brice A, Stevanin G. Am J Hum Genet. 2012

Chapitres de livres :

1) M. Soshan et al. (eds.), TUMOR CELL METABOLISM : PATHWAYS, REGULATION AND BIOLOGY. Chapter 1. **Metabolic Remodeling in Bioenergetic Disorders and Cancer. Springer 2014 (in press). Emilie OBRE and Rodrigue ROSSIGNOL**

2) J. Neuzil et al. (eds.), Mitochondria: The Anti-cancer Target for the Third Millennium. DOI 10.1007/978-94-017-8984-4_11, © Springer Science+Business Media Dordrecht 2014. Chapter 11. **Relevance of Mitochondrial Functions and Plasticity in Tumor Biology. Emilie Obre, Nadège Bellance, Caroline Jose, Giovanni Benard, Karine Nouette-Gaulain, and Rodrigue Rossignol**

Congrès

9 avril 2014 : Journée de l'Ecole Doctorale : Présentation poster

17 octobre 2013 : Présentation oral au GSO (canceropôle)

10 avril 2013 : Journée de l'Ecole Doctorale : Présentation poster.

4 Décembre 2012 : Cancer Cell Metabolism : Beyond Warburg (Toulouse).

22 Novembre 2012 : Les Cancers en 2012 : Tout ce qu'un chercheur ne devrait pas ignorer (Paris).

8-9 Novembre 2012 : Irish area section of the biochemical society (IASBS) meeting : Regulation of metabolism in cancer and immune Cells (Dublin).

Septembre 2012 : Obtention du prix poster à la SFAR (société française d'Anesthésie et Réanimation)

11 Avril 2012 : Journée de l'Ecole Doctorale.

5-8 Septembre 2011: MiP2011 - 8th Conference on Mitochondrial Physiology and Pathology (Bordeaux).

7 Avril 2010 : Journée de l'Ecole Doctorale

REFERENCES

Abdel-Rahman, O., and Fouad, M. (2014). Sorafenib-based combination as a first line treatment for advanced hepatocellular carcinoma: a systematic review of the literature. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *91*, 1–8.

Abrantes, A.M., Tavares, L.C., Pires, S., Casalta-Lopes, J., Mendes, C., Simões, M., Grazina, M.M., Carvalho, R. a, and Botelho, M.F. (2014). Metabolic effects of hypoxia in colorectal cancer by (13) C NMR isotopomer analysis. *Biomed Res. Int.* *2014*, 759791.

Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M.L., Pérez-Martos, A., and Enriquez, J.A. (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol. Cell* *32*, 529–539.

Agius, L., and Stubbs, M. (2000). Investigation of the mechanism by which glucose analogues cause translocation of glucokinase in hepatocytes: evidence for two glucose binding sites. *Biochem. J.* *346 Pt 2*, 413–421.

Alazard, N., Pfeiffer, K., Gallou, C., Be, C., Demont, J., Bouvier, R., and Godinot, C. (2002). Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *23*, 759–768.

Althoff, T., Mills, D.J., Popot, J.-L., and Kühlbrandt, W. (2011). Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I1III2IV1. *EMBO J.* *30*, 4652–4664.

Amary, M.F., Damato, S., Halai, D., Eskandarpour, M., Berisha, F., Bonar, F., McCarthy, S., Fantin, V.R., Straley, K.S., Lobo, S., et al. (2011). Ollier disease and Maffucci syndrome are caused by somatic mosaic mutations of IDH1 and IDH2. *Nat. Genet.* *43*, 1262–1265.

Amchenkova AA, Bakeeva LE, Chentsov YS, Skulachev VP, Z.D. (1988). Coupling Membranes As Energy-transmitting Cables. *Biol. Mol. Chem. Bioorganic Republics, Sov. Social.* *107*, 481–495.

Anand, R., Wai, T., Baker, M.J., Kladt, N., Schauss, A.C., Rugarli, E., and Langer, T. (2014). The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J. Cell Biol.* *204*, 919–929.

Andreyev, H.J., Norman, a R., Cunningham, D., Oates, J.R., and Clarke, P. a (1998). Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter “RASCAL” study. *J. Natl. Cancer Inst.* *90*, 675–684.

Angiolillo, A.L., Schore, R.J., Devidas, M., Borowitz, M.J., Carroll, A.J., Gastier-Foster, J.M., Heerema, N. a, Keilani, T., Lane, A.R., Loh, M.L., et al. (2014). Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties of Calaspargase Pegol Escherichia coli L-Asparaginase in the Treatment of Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia: Results From Children’s Oncology Group Study AALL07P4. *J. Clin. Oncol.* 1–10.

Del Arco, a., and Satrustegui, J. (1998). Molecular Cloning of Aralar, a New Member of the Mitochondrial Carrier Superfamily That Binds Calcium and Is Present in Human Muscle and Brain. *J. Biol. Chem.* *273*, 23327–23334.

Arnold, S., and Kadenbach, B. (1997). an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase. *354*, 350–354.

Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. a, and Schägger, H. (1998). Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J.* *17*, 7170–7178.

Baggstrom, M.Q., Qi, Y., Koczywas, M., Johnson, E.A., Millward, M.J., Murphy, S.C., Erlichman, C., Rudin, C.M., and Govindan, R. (2012). A phase II study of AT-101 (Gossypol) in chemotherapy-sensitive recurrent extensive-stage small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* *6*, 1757–1760.

Baines, A.T., Xu, D., and Der, C.J. (2012). Inhibition of Ras for cancer treatment : the search continues. *Futur. Med Chem.* *3*, 1787–1808.

Bakeeva, L.E., Chentsov, YuS, Skulachev, V. (1978). Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *Biochim Biophys Acta.*

- Barr, P.M., Miller, T.P., Friedberg, J.W., Peterson, D.R., Baran, A.M., Herr, M., Spier, C.M., Cui, H., Roe, D.J., Persky, D.O., et al. (2014). Phase 2 study of imexon, a prooxidant molecule, in relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 124, 1259–1265.
- Bauer, F., Elbers, C.C., Adan, R.A.H., Loos, R.J.F., Onland-moret, N.C., Grobbee, D.E., Vliet-ostaptchouk, J.V. Van, Wijmenga, C., and Schouw, Y.T. Van Der (2009). Obesity genes identified in genome-wide association studies are associated with adiposity measures and potentially with nutrient-specific food preference 1 – 3. *Am. J. Clin. Nutr.*
- Baysal, B.E. (2000). Mutations in SDHD, a Mitochondrial Complex II Gene, in Hereditary Paraganglioma. *Science* (80-.). 287, 848–851.
- Bellance, N., Benard, G., Furt, F., Begueret, H., Smolková, K., Passerieux, E., Delage, J.P., Baste, J.M., Moreau, P., and Rossignol, R. (2009). Bioenergetics of lung tumors: alteration of mitochondrial biogenesis and respiratory capacity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 2566–2577.
- Benard, G., Faustin, B., Passerieux, E., Galinier, a, Rocher, C., Bellance, N., Delage, J.-P., Casteilla, L., Letellier, T., and Rossignol, R. (2006a). Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291, C1172–82.
- Benard, G., Faustin, B., Passerieux, E., Galinier, A., Rocher, C., Bellance, N., Delage, J., Casteilla, L., Letellier, T., and Rossignol, R. (2006b). Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. 1172–1182.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., and Rossignol, R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J. Cell Sci.* 120, 838–848.
- Benard, G., Bellance, N., Jose, C., Melser, S., Nouette-Gaulain, K., and Rossignol, R. (2010). Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 698–709.
- Benard, G., Trian, T., Bellance, N., Berger, P., Lavie, J., Espil-Taris, C., Rocher, C., Eimer-Bouillot, S., Goizet, C., Nouette-Gaulain, K., et al. (2012). Adaptive Capacity of Mitochondrial Biogenesis and of Mitochondrial Dynamics in Response to Pathogenic Respiratory Chain Dysfunction. *Antioxid. Redox Signal.*
- Benard, G., Trian, T., Bellance, N., Berger, P., Lavie, J., Espil-Taris, C., Rocher, C., Eimer-Bouillot, S., Goizet, C., Nouette-Gaulain, K., et al. (2013). Adaptive capacity of mitochondrial biogenesis and of mitochondrial dynamics in response to pathogenic respiratory chain dysfunction. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 350–365.
- Berger, S.L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 142–148.
- Bianchi, C., Genova, M.L., Parenti Castelli, G., and Lenaz, G. (2004). The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J. Biol. Chem.* 279, 36562–36569.
- Boekema, E.J., and Braun, H.-P. (2007). Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J. Biol. Chem.* 282, 1–4.
- Boidot, R., Végran, F., Meulle, A., Le Breton, A., Dessy, C., Sonveaux, P., Lizard-Nacol, S., and Feron, O. (2012). Regulation of monocarboxylate transporter MCT1 expression by p53 mediates inward and outward lactate fluxes in tumors. *Cancer Res.* 72, 939–948.
- Bonnet, S., Archer, S.L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., Lee, C.T., Lopaschuk, G.D., Puttagunta, L., Bonnet, S., et al. (2007). A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 11, 37–51.
- Boren, J., Cascante, M., Marin, S., Comín-Anduix, B., Centelles, J.J., Lim, S., Bassilian, S., Ahmed, S., Lee, W.N., and Boros, L.G. (2001). Gleevec (STI571) influences metabolic enzyme activities and glucose carbon flow toward nucleic acid and fatty acid synthesis in myeloid tumor cells. *J. Biol. Chem.* 276, 37747–37753.

Bos, J.L. (1989). ras Oncogenes in Human Cancer : A Review ras Oncogenes in Human Cancer : A Review1. 4682–4689.

Bozic, I., Antal, T., Ohtsuki, H., Carter, H., Kim, D., Chen, S., Karchin, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Nowak, M. a (2010). Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18545–18550.

Brahimi-Horn, M.C., Chiche, J., and Pouyssegur, J. (2007). Hypoxia and cancer. *J. Mol. Med. (Berl)*. 85, 1301–1307.

Braun, B.S., and Shannon, K. (2008). Targeting Ras in myeloid leukemias. *Clin. Cancer Res.* 14, 2249–2252.

Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., et al. (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011–2015.

Bulteau, A.-L., Ikeda-Saito, M., and Szweda, L.I. (2003). Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry* 42, 14846–14855.

Burgess, S.C., Hausler, N., Merritt, M., Jeffrey, F.M.H., Storey, C., Milde, A., Koshy, S., Lindner, J., Magnuson, M. a, Malloy, C.R., et al. (2004). Impaired tricarboxylic acid cycle activity in mouse livers lacking cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* 279, 48941–48949.

Butterworth J, Yates CM, R.G. (1985). Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and gamma-glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases. *J Neurol Sci*.

Byun, J., Choi, Y., Kang, Y.N., Jang, B.K., and Kang, K.J. (2014). This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please. *Hepatology* 1–45.

Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J.N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J.C., Elliott, P.J., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458, 1056–1060.

Caro, P., Kishan, A.U., Norberg, E., Stanley, I. a, Chapuy, B., Ficarro, S.B., Polak, K., Tondera, D., Gounarides, J., Yin, H., et al. (2012). Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 22, 547–560.

Carracedo, A.; L.C.C. and P.P.P. (2013). Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer* 13, 227–232.

Cerveny, K.L., Tamura, Y., Zhang, Z., Jensen, R.E., and Sesaki, H. (2007). Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends Cell Biol.* 17, 563–569.

Cetinbas, N., Dugaard, M., Mullen, a R., Hajee, S., Rotblat, B., Lopez, a, Li, a, DeBerardinis, R.J., and Sorensen, P.H. (2014). Loss of the tumor suppressor Hsc1 leads to ROS-dependent glutamine addiction. *Oncogene* 1–6.

Chance, B., and Williams, G.R. (1955). ARTICLE : RESPIRATORY ENZYMES IN.

Chance, B., and Williams, G.R. (1956). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzym. Relat Subj Biochem.* 17:65-134.

Chaneton, B., Hillmann, P., Zheng, L., Martin, A.C.L., Maddocks, O.D.K., Chokkathukalam, A., Coyle, J.E., Jankevics, A., Holding, F.P., Vousden, K.H., et al. (2012). Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2. *Nature* *491*, 458–462.

Chapiro, J., Sur, S., Savic, L.J., Ganapathy-Kaniappan, S., Reyes, J., Duran, R., Chettiar-Thiruganasambandam, S., Moats, C.R., Lin, M., Luo, W., et al. (2014). Systemic Delivery of Microencapsulated 3-Bromopyruvate for the Therapy of Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.*

Chem, J.B., Reitzer, J., and Wice, M. (1979). Evidence that glutamine , not sugar , is the major energy source for cultured HeLa Evidence Cultured That Glutamine , HeLa Cells * Not Sugar , Is the Major Energy Source.

Chen, J., Chung, F., Yang, G., Pu, M., Gao, H., Jiang, W., Yin, H., Capka, V., Kasibhatla, S., Laffitte, B., et al. (2013). Phosphoglycerate dehydrogenase is dispensable for breast tumor maintenance and growth. *Oncotarget* *4*.

Cheng, T., Sudderth, J., Yang, C., Mullen, A.R., Jin, E.S., and Matés, J.M. (2011). Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells.

Chevrollier, A., Loiseau, D., Reynier, P., and Stepien, G. (2011). Adenine nucleotide translocase 2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* *1807*, 562–567.

Chiche, J., Le Fur, Y., Vilmen, C., Frassinetti, F., Daniel, L., Halestrap, A.P., Cozzzone, P.J., Pouyssegur, J., and Lutz, N.W. (2012). In vivo pH in metabolic-defective Ras-transformed fibroblast tumors: key role of the monocarboxylate transporter, MCT4, for inducing an alkaline intracellular pH. *Int. J. Cancer* *130*, 1511–1520.

Clerc, P., Bensaadi, N., Pradel, P., and Vaysse, N. (1991). Lipid-dependent Proliferation of Pancreatic Cancer Cell Lines Lipid-dependent Proliferation of Pancreatic Cancer Cell Lines1. 3633–3638.

Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M.E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L.C., et al. (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* *155*, 160–171.

Collinson (1994a). Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F1-ATPase. *Biochemistry*.

Collinson (1994b). Collinson. *J Mol Biol*.

Cori, C.F., and Cori, G.T. (1929). ARTICLE : GLYCOGEN FORMATION IN THE LIVER FROM d - AND l - LACTIC ACID. 389–403.

Cosentino, C., Grieco, D., and Costanzo, V. (2011). ATM activates the pentose phosphate pathway promoting anti-oxidant defence and DNA repair. *EMBO J.* *30*, 546–555.

Cossins, E.A., and Chen, L. (1997). REVIEW ARTICLE NUMBER 119 FOLATES AND ONE-CARBON METABOLISM IN PLANTS AND FUNGI. *45*.

Csibi, A., Fendt, S.-M., Li, C., Poulogiannis, G., Choo, A.Y., Chapski, D.J., Jeong, S.M., Dempsey, J.M., Parkhitko, A., Morrison, T., et al. (2013). The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. *Cell* *153*, 840–854.

Dang, C. V, Kim, J., Gao, P., and Yustein, J. (2008). The interplay between MYC and HIF in cancer. *8*, 51–56.

Dang, C. V, Le, A., and Gao, P. (2009). MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin. Cancer Res.* *15*, 6479–6483.

Das, A.K., Milam, J.E., Reddy, R.C., and Hajra, A.K. (2006). Facile syntheses of acyl dihydroxyacetone phosphates and lysophosphatidic acids having different acyl groups. *J. Lipid Res.* *47*, 1874–1880.

- David, C.J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P., and Manley, J.L. (2010). HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* *463*, 364–368.
- Davis, M.I., Gross, S., Shen, M., Straley, K.S., Pragani, R., Lea, W. a, Popovici-Muller, J., DeLaBarre, B., Artin, E., Thorne, N., et al. (2014). Biochemical, cellular, and biophysical characterization of a potent inhibitor of mutant isocitrate dehydrogenase IDH1. *J. Biol. Chem.* *289*, 13717–13725.
- DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., and Thompson, C.B. (2007a). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 19345–19350.
- DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., and Thompson, C.B. (2007b). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 19345–19350.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* *7*, 11–20.
- DeNicola, G.M., Karreth, F. a, Humpton, T.J., Gopinathan, A., Wei, C., Frese, K., Mangal, D., Yu, K.H., Yeo, C.J., Calhoun, E.S., et al. (2011). Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* *475*, 106–109.
- Dhup, S., Kumar Dadhich, R., Ettore Porporato, P., and Sonveaux, P. (2012a). Multiple Biological Activities of Lactic Acid in Cancer: Influences on Tumor Growth, Angiogenesis and Metastasis. *Curr. Pharm. Des.* *18*, 1319–1330.
- Dhup, S., Dadhich, R.K., Porporato, P.E., and Sonveaux, P. (2012b). Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Curr. Pharm. Des.* *18*, 1319–1330.
- Du, F., Zhu, X.-H., Zhang, Y., Friedman, M., Zhang, N., Ugurbil, K., and Chen, W. (2008). Tightly coupled brain activity and cerebral ATP metabolic rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 6409–6414.
- Duivenvoorden, W.C.M., Popovic, S.V., and Lhoták, S. (2002). Doxycycline Decreases Tumor Burden in a Bone Metastasis Model of Human Breast Cancer Advances in Brief Doxycycline Decreases Tumor Burden in a Bone Metastasis Model of Human. *Cancer Res.* 1588–1591.
- Ecker, J., and Liebisch, G. (2014). Application of stable isotopes to investigate the metabolism of fatty acids, glycerophospholipid and sphingolipid species. *Prog. Lipid Res.* *54*, 14–31.
- Eijkelenboom, A., and Burgering, B.M.T. (2013). FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 83–97.
- Elstrom, R.L., Bauer, D.E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M.H., Plas, D.R., Zhuang, H., Cinalli, R.M., Alavi, A., Rudin, C.M., et al. (2004). Akt Stimulates Aerobic Glycolysis in Cancer Cells Akt Stimulates Aerobic Glycolysis in Cancer Cells. 3892–3899.
- Emadi, A., Jun, S.A., Tsukamoto, T., Fathi, A.T., Minden, M.D., and Dang, C. V (2014). Inhibition of glutaminase selectively suppresses the growth of primary acute myeloid leukemia cells with IDH mutations. *Exp. Hematol.* *42*, 247–251.
- Emerling, B.M., Viollet, B., Tormos, K. V, and Chandel, N.S. (2007). Compound C inhibits hypoxic activation of HIF-1 independent of AMPK. *FEBS Lett.* *581*, 5727–5731.
- Esslinger, C.S., Cybulski, K. a, and Rhoderick, J.F. (2005). Ngamma-aryl glutamine analogues as probes of the ASCT2 neutral amino acid transporter binding site. *Bioorg. Med. Chem.* *13*, 1111–1118.

Estate, G., Road, S., and Infirmiry, G.R. (1999). STRUCTURAL DIFFERENCES BETWEEN VALINE-12 AND ASPARTATE-12 RAS PROTEINS MAY MODIFY. 438, 433–438.

Faber, A.C., Coffee, E.M., Costa, C., Dastur, A., Ebi, H., Hata, A.N., Yeo, A.T., Edelman, E.J., Song, Y., Tam, A.T., et al. (2014). mTOR inhibition specifically sensitizes colorectal cancers with KRAS or BRAF mutations to BCL-2/BCL-XL inhibition by suppressing MCL-1. *Cancer Discov.* 4, 42–52.

Falk MJ, Li D, Gai X, McCormick E, Place E, Lasorsa FM, Otieno FG, Hou C, Kim CE, Abdel-Magid N, Vazquez L, Mentch FD, Chiavacci R, Liang J, Liu X, Jiang H, Giannuzzi G, Marsh ED, Yiran G, Tian L, Palmieri F, H.H. (2014). AGC1 Deficiency Causes Infantile Epilepsy, Abnormal Myelination, and Reduced N-Acetylaspartate. *JIMD Rep.*

Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., Dupuy, F., Chambers, C., Fuerth, B.J., Viollet, B., et al. (2013). AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metab.* 17, 113–124.

Faubert, B., Vincent, E.E., Poffenberger, M.C., and Jones, R.G. (2014a). The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: Many faces of a metabolic regulator. *Cancer Lett.* 1–6.

Faubert, B., Vincent, E.E., Griss, T., Samborska, B., Izreig, S., Svensson, R.U., Mamer, O. a, Avizonis, D., Shackelford, D.B., Shaw, R.J., et al. (2014b). Loss of the tumor suppressor LKB1 promotes metabolic reprogramming of cancer cells via HIF-1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2554–2559.

Fendt, S.-M., Bell, E.L., Keibler, M. a, Olenchock, B. a, Mayers, J.R., Wasylenko, T.M., Vokes, N.I., Guarente, L., Vander Heiden, M.G., and Stephanopoulos, G. (2013). Reductive glutamine metabolism is a function of the α -ketoglutarate to citrate ratio in cells. *Nat. Commun.* 4, 2236.

Feramisco, J.R., Gross, M., Kamata, T., Rosenberg, M., and Sweet, R.W. (1984). Microinjection of the oncogene form of the human H-ras (T-24) protein results in rapid proliferation of quiescent cells. *Cell* 38, 109–117.

Flaherty, K.T., Infante, J.R., Daud, A., Gonzalez, R., Kefford, R.F., Sosman, J., Hamid, O., Schuchter, L., Cebon, J., Ibrahim, N., et al. (2012). Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N. Engl. J. Med.* 367, 1694–1703.

Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suñer, D., Cigudosa, J.C., Urioste, M., Benitez, J., et al. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10604–10609.

Fredrich, T., Heek, P.V.A.N., Leif, H., Ohnishi, T., Forche, E., Kunze, B., Jansen, R., Trowitzsch-kienast, W., Hofle, G., Reichenbach, H., et al. (1994). Two binding sites of inhibitors in NADH : ubiquinone oxidoreductase (complex I) Relationship of one site with the ubiquinone-binding site. 698, 691–698.

Frey, T.G., and Mannella, C. a (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25, 319–324.

Fuchs, B.C., and Bode, B.P. (2005). Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? *Semin. Cancer Biol.* 15, 254–266.

Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J., Shimoda, L., Dang, C. V, and Semenza, G.L. (2007). HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 129, 111–122.

Fulco, M., Cen, Y., Zhao, P., Hoffman, E.P., McBurney, M.W., Sauve, A. a, and Sartorelli, V. (2008). Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Dev. Cell* 14, 661–673.

Furtado, C.M., Marcondes, M.C., Sola-Penna, M., de Souza, M.L.S., and Zancan, P. (2012). Clotrimazole preferentially inhibits human breast cancer cell proliferation, viability and glycolysis. *PLoS One* 7, e30462.

Ganapathy-Kanniappan, S., and Geschwind, J.-F.H. (2013). Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects. *Mol. Cancer* 12, 152.

Ganjam, G.K., Dimova, E.Y., Unterman, T.G., and Kietzmann, T. (2009). FoxO1 and HNF-4 are involved in regulation of hepatic glucokinase gene expression by resveratrol. *J. Biol. Chem.* 284, 30783–30797.

Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.-C., Lee, Y.-S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K.I., De Marzo, A.M., Van Eyk, J.E., Mendell, J.T., et al. (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 458, 762–765.

García, J.J., Morales-Ríos, E., Cortés-Hernandez, P., and Rodríguez-Zavala, J.S. (2006). The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial F1F0-ATP synthase. *Biochemistry* 45, 12695–12703.

Garedew, A., Hütter, E., Haffner, B., Gradl, P., and Gradl, L. (2005). High-resolution Respirometry for the Study of Mitochondrial Function in Health and Disease . The OROBOROS Oxygraph-2k. In 11th Congress Eu. Shock Soc., pp. 107–111.

Gasparre, G., Kurelac, I., Capristo, M., Iommarini, L., Ghelli, A., Ceccarelli, C., Nicoletti, G., Nanni, P., De Giovanni, C., Scotlandi, K., et al. (2011). A mutation threshold distinguishes the antitumorigenic effects of the mitochondrial gene MTND1, an oncojanus function. *Cancer Res.* 71, 6220–6229.

Gatenby, R. a, and Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4, 891–899.

Gatza, E., Wahl, D.R., Opipari, A.W., Sundberg, T.B., Reddy, P., Liu, C., Glick, G.D., and Ferrara, J.L.M. (2011). Manipulating the bioenergetics of alloreactive T cells causes their selective apoptosis and arrests graft-versus-host disease. *Sci. Transl. Med.* 3, 67ra8.

Geissler, a, Krimmer, T., Bömer, U., Guiard, B., Rassow, J., and Pfanner, N. (2000). Membrane potential-driven protein import into mitochondria. The sorting sequence of cytochrome b(2) modulates the deltapsi-dependence of translocation of the matrix-targeting sequence. *Mol. Biol. Cell* 11, 3977–3991.

Gellerich, F.N., Gizatullina, Z., Trumbekaite, S., Korzeniewski, B., Gaynutdinov, T., Seppet, E., Vielhaber, S., Heinze, H.-J., and Striggow, F. (2012). Cytosolic Ca²⁺ regulates the energization of isolated brain mitochondria by formation of pyruvate through the malate-aspartate shuttle. *Biochem. J.* 443, 747–755.

Gellerich, F.N., Gizatullina, Z., Gainutdinov, T., Muth, K., Seppet, E., Orynbayeva, Z., and Vielhaber, S. (2013). The control of brain mitochondrial energization by cytosolic calcium: The mitochondrial gas pedal. *IUBMB Life* 65, 180–190.

Genova, M.L., Baracca, a, Biondi, a, Casalena, G., Faccioli, M., Falasca, a I., Formiggini, G., Sgarbi, G., Solaini, G., and Lenaz, G. (2008). Is supercomplex organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity? *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 740–746.

Gimenez-Roqueplo, a P., Favier, J., Rustin, P., Mourad, J.J., Plouin, P.F., Corvol, P., Rötig, a, and Jeunemaitre, X. (2001). The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary paraganglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 1186–1197.

Giorgio, M., Migliaccio, E., Orsini, F., Paolucci, D., Moroni, M., Contursi, C., Pelliccia, G., Luzi, L., Minucci, S., Marcaccio, M., et al. (2005). Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 122, 221–233.

Gough, D.J., Corlett, A., Schlessinger, K., Wegrzyn, J., Larner, A.C., and Levy, D.E. (2009). Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science* 324, 1713–1716.

- Graves, J.A., Wang, Y., Sims-Lucas, S., Cherok, E., Rothermund, K., Branca, M.F., Elster, J., Beer-Stolz, D., Van Houten, B., Vockley, J., et al. (2012). Mitochondrial structure, function and dynamics are temporally controlled by c-Myc. *PLoS One* 7, e37699.
- Guderley, H. (2004). Metabolic responses to low temperature in fish muscle. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 79, 409–427.
- Guppy, M., Leedman, P., Zu, X., and Russell, V. (2002). turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. *Biochem J* 315, 309–315.
- Gupta, V., and Bamezai, R.N.K. (2010). Human pyruvate kinase M2: a multifunctional protein. *Protein Sci.* 19, 2031–2044.
- Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., et al. (2011). Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. 2507–2516.
- Hackenbrock, C.R., Chazotte, B., and Gupte, S.S. (1986). The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* 18, 331–368.
- Hadad, S.M., Baker, L., Quinlan, P.R., Robertson, K.E., Bray, S.E., Thomson, G., Kellock, D., Jordan, L.B., Purdie, C. a, Hardie, D.G., et al. (2009). Histological evaluation of AMPK signalling in primary breast cancer. *BMC Cancer* 9, 307.
- Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W., and Weinberg, R.A. (1999). Creation of human tumourcells with de ® ned genetic elements. *Nature* 400, 464–468.
- Hajra, A.K. (1996). Amiya K. Hajra. *Prog. Lipid Res.* 34, 343–364.
- Hales, K.G. (2004). The machinery of mitochondrial fusion, division, and distribution, and emerging connections to apoptosis. *Mitochondrion* 4, 285–308.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. a (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., and Francisco, S. (2000). The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco. 100, 57–70.
- Hardie, D.G., and Alessi, D.R. (2013). LKB1 and AMPK and the cancer-metabolism link - ten years after. *BMC Biol.* 11, 36.
- Hardie, D.G., Scott, J.W., Pan, D. a, and Hudson, E.R. (2003). Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* 546, 113–120.
- Hart, C.E., Race, V., Achouri, Y., Wiame, E., Sharrard, M., Olpin, S.E., Watkinson, J., Bonham, J.R., Jaeken, J., Matthijs, G., et al. (2007). Phosphoserine aminotransferase deficiency: a novel disorder of the serine biosynthesis pathway. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 931–937.
- Hatefi (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem.*
- Hatefi, Y., Haavik, A.G., Fowler, L.R., and Griffiths, E. (1962). ARTICLE : Studies on the Electron Transfer System : ELECTRON TRANSFER SYSTEM on the Electron.
- Hatzivassiliou, G., Zhao, F., Bauer, D.E., Andreadis, C., Shaw, A.N., Dhanak, D., Hingorani, S.R., Tuveson, D. a, and Thompson, C.B. (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* 8, 311–321.

Hawley, S. a, Ross, F. a, Chevtzoff, C., Green, K. a, Evans, A., Fogarty, S., Towler, M.C., Brown, L.J., Ogunbayo, O. a, Evans, a M., et al. (2010). Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab.* 11, 554–565.

Hawley, S. a., Selbert, M. a., Goldstein, E.G., Edelman, a. M., Carling, D., and Hardie, D.G. (1995). 5'-AMP Activates the AMP-activated Protein Kinase Cascade, and Ca²⁺/Calmodulin Activates the Calmodulin-dependent Protein Kinase I Cascade, via Three Independent Mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270, 27186–27191.

Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Mäkelä, T.P., Alessi, D.R., and Hardie, D.G. (2003). of Biology BioMed Central Complexes between the LKB1 tumor suppressor , STRAD \square / \square and MO25 \square / \square are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. 1–16.

Hazel, J.R. (1995). Thermal Adaptation in Biological Membranes: Is Homeoviscous Adaptation the Explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57: 19-42.

Heilbronn, L.K., and Ravussin, E. (2003). Calorie restriction and aging: review of the literature and implications for studies in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 361–369.

Heineman, F.W., and Balaban, R.S. (1990). Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance Analysis of Transient Changes of Canine Myocardial Metabolism In Vivo. 85, 843–852.

Hepatocytes, R., Wang, S., Chen, H., Sheen, L., Lii, C., and Al, W.E.T. (1997). Biochemical and Molecular Roles of Nutrients Methionine and Cysteine Affect Glutathione Level , Glutathione-Related Enzyme Activities and the Expression of Glutathione S-Transferase. 2135–2141.

Herst, P.M., and Berridge, M. V (2007). Cell surface oxygen consumption: a major contributor to cellular oxygen consumption in glycolytic cancer cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 170–177.

Hervouet, E., Cízková, A., Demont, J., Vojtísková, A., Pecina, P., Franssen-van Hal, N.L.W., Keijer, J., Simonnet, H., Ivánek, R., Kmoch, S., et al. (2008). HIF and reactive oxygen species regulate oxidative phosphorylation in cancer. *Carcinogenesis* 29, 1528–1537.

Hirschey, M.D., Shimazu, T., Huang, J.-Y., Schwer, B., and Verdin, E. (2011a). SIRT3 regulates mitochondrial protein acetylation and intermediary metabolism. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 76, 267–277.

Hirschey, M.D., Shimazu, T., Jing, E., Grueter, C. a, Collins, A.M., Aouizerat, B., Stančáková, A., Goetzman, E., Lam, M.M., Schwer, B., et al. (2011b). SIRT3 deficiency and mitochondrial protein hyperacetylation accelerate the development of the metabolic syndrome. *Mol. Cell* 44, 177–190.

Hirschhaeuser, F., Menne, H., Dittfeld, C., West, J., Mueller-Klieser, W., and Kunz-Schughart, L. a (2010a). Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* 148, 3–15.

Hirschhaeuser, F., Walenta, S., and Mueller-Klieser, W. (2010b). Efficacy of catumaxomab in tumor spheroid killing is mediated by its trifunctional mode of action. *Cancer Immunol. Immunother.* 59, 1675–1684.

Hirst, J., Carroll, J., Fearnley, I.M., Shannon, R.J., and Walker, J.E. (2003). The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1604, 135–150.

HK, K., RJ, R., M, V.D., and E., R. (1991). Regulation of 6-phosphofructo-1-kinase activity in ras-transformed rat-1 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys.*

Höchli, M., and Hackenbrock, C.R. (1976). Fluidity in mitochondrial membranes: thermotropic lateral translational motion of intramembrane particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73, 1636–1640.

Hoekstra, A.S., and Bayley, J.-P. (2013). The role of complex II in disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1827, 543–551.

- Hollenbeck, P.J., and Saxton, W.M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *J. Cell Sci.* 118, 5411–5419.
- Holloszy, J.O., and Coyle, E.F. (1984). Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J. Appl. Physiol.* 56, 831–838.
- Holz, M.K., Ballif, B. a, Gygi, S.P., and Blenis, J. (2005). mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 123, 569–580.
- Hood, D. a, Irrcher, I., Ljubcic, V., and Joseph, A.-M. (2006). Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. *J. Exp. Biol.* 209, 2265–2275.
- Houtkooper, R.H., Pirinen, E., and Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 225–238.
- Huang, L.E., Gu, J., Schau, M., and Bunn, H.F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7987–7992.
- Huxtable, R. (1992). Actions of Taurine. *Physiol Rev.* 72.
- Inokuchi-Shimizu, S., Park, E.J., Roh, Y.S., Yang, L., Zhang, B., Song, J., Liang, S., Pimienta, M., Taniguchi, K., Wu, X., et al. (2014). TAK1-mediated autophagy and fatty acid oxidation prevent hepatosteatosis and tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* 124, 3566–3578.
- Inoue-Yamauchi, A., and Oda, H. (2012). Depletion of mitochondrial fission factor DRP1 causes increased apoptosis in human colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421, 81–85.
- Iommarini, L., Kurelac, I., Capristo, M., Calvaruso, M.A., Giorgio, V., Bergamini, C., Ghelli, A., Nanni, P., De Giovanni, C., Carelli, V., et al. (2014). Different mtDNA mutations modify tumor progression in dependence of the degree of respiratory complex I impairment. *Hum. Mol. Genet.* 23, 1453–1466.
- Irani, K. (1997). Mitogenic Signaling Mediated by Oxidants in Ras-Transformed Fibroblasts. *Science* (80-.). 275, 1649–1652.
- Ishikura, K., Miyazaki, T., Ra, S., Endo, S., and Nakamura, Y. (2011). Effect of taurine supplementation on the alterations in amino acid content in skeletal muscle with exercise in rat. 306–314.
- Iynedjian, P.B. (1993). Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem. J.* 293 (Pt 1, 1–13.
- Jensen, K.S., Binderup, T., Jensen, K.T., Therkelsen, I., Borup, R., Nilsson, E., Mulhaupt, H., Bouchard, C., Quistorff, B., Kjaer, A., et al. (2011). FoxO3A promotes metabolic adaptation to hypoxia by antagonizing Myc function. *EMBO J.* 30, 4554–4570.
- Jerby, L., and Ruppin, E. (2012). Predicting drug targets and biomarkers of cancer via genome-scale metabolic modeling. *Clin. Cancer Res.* 18, 5572–5584.
- Jerby, L., Wolf, L., Denkert, C., Stein, G.Y., Hilvo, M., Oresic, M., Geiger, T., and Ruppin, E. (2012). Metabolic associations of reduced proliferation and oxidative stress in advanced breast cancer. *Cancer Res.* 72, 5712–5720.
- Jiang, W., Wang, S., Xiao, M., Lin, Y., Zhou, L., Lei, Q., Xiong, Y., Guan, K.-L., and Zhao, S. (2011). Acetylation regulates gluconeogenesis by promoting PEPCK1 degradation via recruiting the UBR5 ubiquitin ligase. *Mol. Cell* 43, 33–44.
- Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J., and Thompson, C.B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol. Cell* 18, 283–293.

Jose, C., Bellance, N., and Rossignol, R. (2011). Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 552–561.

Jose, C., Bellance, N., Chatelain, E.H., Benard, G., Nouette-Gaulain, K., and Rossignol, R. (2012). Antiproliferative activity of levobupivacaine and aminoimidazole carboxamide ribonucleotide on human cancer cells of variable bioenergetic profile. *Mitochondrion* 12, 100–109.

Jose, C., Melser, S., Benard, G., and Rossignol, R. (2013a). Mitoplasticity: adaptation biology of the mitochondrion to the cellular redox state in physiology and carcinogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 808–849.

Jose, C., Melser, S., Benard, G., and Rossignol, R. (2013b). Mitoplasticity: adaptation biology of the mitochondrion to the cellular redox state in physiology and carcinogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 808–849.

Kaestner, K.H. (2000). The hepatocyte nuclear factor 3 (HNF3 or FOXA) family in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 281–285.

Kalhan, S.C., and Hanson, R.W. (2012). Resurgence of serine: an often neglected but indispensable amino Acid. *J. Biol. Chem.* 287, 19786–19791.

Kaplan, O., Navon, G., Lyon, R.C., Faustino, P.J., Straka, E.J., and Cohen, J.S. (1990). Effects of 2-Deoxyglucose on Drug-sensitive and Drug-resistant Human Breast Cancer Cells : Toxicity and Magnetic Resonance Spectroscopy Studies of Metabolism Effects of 2-Deoxyglucose on Drug-sensitive and Drug-resistant Human Breast Cancer Cells : Toxicity. 544–551.

Katz, C., Zaltsman-Amir, Y., Mostizky, Y., Kollet, N., Gross, A., and Friedler, A. (2012). Molecular basis of the interaction between proapoptotic truncated BID (tBID) protein and mitochondrial carrier homologue 2 (XXXX) protein: key players in mitochondrial death pathway. *J. Biol. Chem.* 287, 15016–15023.

Kelly, G.S. (2010a). A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 2. *Altern. Med. Rev.* 15, 313–328.

Kelly, G.S. (2010b). A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 2. *Altern. Med. Rev.* 15, 313–328.

Keohavong, P., Demichele, M.A., Melacrinis, A.C., Keohavong, P., Demichele, A.A., Melacrinis, A.C., Landreneau, R.J., Weyant, R.J., and Siegfried, J.M. (1996). Detection of K-ras mutations in lung carcinomas : relationship to prognosis . Detection of K-ras Mutations in Lung Carcinomas : Relationship to Prognosis 1. 411–418.

Kéri, G., Schwab, R., Szokoloci, O., Szuts, T., and Szolcsanyi, J. (2005). TT-232: An Anti-tumour and Anti-inflammatory Peptide Therapeutic in Clinical Development. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 11, 3–15.

Khasawneh, J., Schulz, M.D., Walch, A., Rozman, J., Angelis, M.H. De, Klingenspor, M., Buck, A., and Schwaiger, M. (2009). Inflammation and mitochondrial fatty acid β -oxidation link obesity to early tumor promotion.

Killian, J.K., Kim, S.Y., Miettinen, M., Smith, C., Merino, M., Tsokos, M., Quezado, M., Smith, W.I., Jahromi, M.S., Xekouki, P., et al. (2013). Succinate dehydrogenase mutation underlies global epigenomic divergence in gastrointestinal stromal tumor. *Cancer Discov.* 3, 648–657.

Kim, H.-Y., Huang, B.X., and Spector, A. a (2014a). Phosphatidylserine in the brain: Metabolism and function. *Prog. Lipid Res.* 56C, 1–18.

Kim, S.K., Jung, W.H., and Koo, J.S. (2014b). Differential expression of enzymes associated with serine/glycine metabolism in different breast cancer subtypes. *PLoS One* 9, e101004.

- Kissová, I., Deffieu, M., Manon, S., and Camougrand, N. (2004). Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 39068–39074.
- Kluza, J., Corazao-Rozas, P., Touil, Y., Jendoubi, M., Maire, C., Guerreschi, P., Jonneaux, A., Ballot, C., Balayssac, S., Valable, S., et al. (2012). Inactivation of the HIF-1 α /PDK3 signaling axis drives melanoma toward mitochondrial oxidative metabolism and potentiates the therapeutic activity of pro-oxidants. *Cancer Res.* 72, 5035–5047.
- Ko, Y.H., Delannoy, M., Hullihen, J., Chiu, W., and Pedersen, P.L. (2003). Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP. *J. Biol. Chem.* 278, 12305–12309.
- Koivunen, P., Hirsilä, M., Remes, A.M., Hassinen, I.E., Kivirikko, K.I., and Myllyharju, J. (2007). Inhibition of hypoxia-inducible factor (HIF) hydroxylases by citric acid cycle intermediates: possible links between cell metabolism and stabilization of HIF. *J. Biol. Chem.* 282, 4524–4532.
- Kompier, L.C., Lurkin, I., van der Aa, M.N.M., van Rhijn, B.W.G., van der Kwast, T.H., and Zwarthoff, E.C. (2010). FGFR3, HRAS, KRAS, NRAS and PIK3CA mutations in bladder cancer and their potential as biomarkers for surveillance and therapy. *PLoS One* 5, e13821.
- Kopnin, P.B., Agapova, L.S., Kopnin, B.P., and Chumakov, P.M. (2007). Repression of sestrin family genes contributes to oncogenic Ras-induced reactive oxygen species up-regulation and genetic instability. *Cancer Res.* 67, 4671–4678.
- Korzeniewski, B. (2007). Regulation of oxidative phosphorylation through parallel activation. *Biophys. Chem.* 129, 93–110.
- Kos, I., Ph, D., Batinic-haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K.W., et al. (2009). Mutations in Gliomas.
- Kraffe, E., Marty, Y., and Guderley, H. (2007). Changes in mitochondrial oxidative capacities during thermal acclimation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: roles of membrane proteins, phospholipids and their fatty acid compositions. *J. Exp. Biol.* 210, 149–165.
- Kulyté, A., Rydén, M., Mejhert, N., Dungner, E., Sjölin, E., Arner, P., and Dahlman, I. (2011a). XXXX in human white adipose tissue and obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E1661–5.
- Kulyté, A., Rydén, M., Mejhert, N., Dungner, E., Sjölin, E., Arner, P., and Dahlman, I. (2011b). XXXX in human white adipose tissue and obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E1661–5.
- Kwitkowski, V.E., Prowell, T.M., Ibrahim, A., Farrell, A.T., Justice, R., Mitchell, S.S., Sridhara, R., and Pazdur, R. (2010). FDA approval summary: temsirolimus as treatment for advanced renal cell carcinoma. *Oncologist* 15, 428–435.
- Lamari, F., Mochel, F., Sedel, F., and Saudubray, J.M. (2013). Disorders of phospholipids, sphingolipids and fatty acids biosynthesis: toward a new category of inherited metabolic diseases. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36, 411–425.
- Lambert, I.H., Kristensen, D.M., Holm, J.B., and Mortensen, O.H. (2014). Physiological role of taurine - from organism to organelle. *Acta Physiol. (Oxf)*.
- Le, A., Cooper, C.R., Gouw, A.M., Dinavahi, R., Maitra, A., Deck, L.M., Royer, R.E., Vander Jagt, D.L., Semenza, G.L., and Dang, C. V (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2037–2042.
- Lei, H., Ugurbil, K., and Chen, W. (2003). Measurement of unidirectional Pi to ATP flux in human visual cortex at 7 T by using in vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14409–14414.

- Leibowitz-Amit, R., Tsarfaty, G., Abargil, Y., Yerushalmi, G.M., Horev, J., and Tsarfaty, I. (2006). Mimp, a mitochondrial carrier homologue, inhibits Met-HGF/SF-induced scattering and tumorigenicity by altering Met-HGF/SF signaling pathways. *Cancer Res.* *66*, 8687–8697.
- Lenaz, G., Fato, R., Formigini, G., and Genova, M.L. (2007). The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion* *7 Suppl*, S8–33.
- Leonhardt, H., Page, a W., Weier, H.U., and Bestor, T.H. (1992). A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* *71*, 865–873.
- Li, F., Wang, Y., Zeller, K.I., Potter, J.J., Wonsey, D.R., Donnell, K.A.O., Kim, J., Yustein, J.T., Lee, L.A., and Dang, C. V (2005). Myc Stimulates Nuclearly Encoded Mitochondrial Genes and Mitochondrial Biogenesis Myc Stimulates Nuclearly Encoded Mitochondrial Genes and Mitochondrial Biogenesis †.
- Liang, J., and Mills, G.B. (2013). AMPK: a contextual oncogene or tumor suppressor? *Cancer Res.* *73*, 2929–2935.
- Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C., and Wu, Z. (2002). Transcriptional co-activator PGC-1 a drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *418*, 797–801.
- Liu, G., Kelly, W.K., Wilding, G., Leopold, L., Brill, K., and Somer, B. (2009). An open-label, multicenter, phase I/II study of single-agent AT-101 in men with castrate-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* *15*, 3172–3176.
- Liu, J., Guo, S., Li, Q., Yang, L., Xia, Z., Zhang, L., Huang, Z., and Zhang, N. (2013). Phosphoglycerate dehydrogenase induces glioma cells proliferation and invasion by stabilizing forkhead box M1. *J. Neurooncol.* *111*, 245–255.
- Liu, W., Fang, Y., Wang, X., Liu, J., Dan, X., and Sun, L. (2014). Overcoming 5-Fu Resistance of Colon Cells through Inhibition of Glut1 by the Specific Inhibitor WZB117. *Asian Pac J Cancer Prev.*
- Liu, Y., Cao, Y., Zhang, W., Bergmeier, S., Qian, Y., Akbar, H., Colvin, R., Ding, J., Tong, L., Wu, S., et al. (2012). A small-molecule inhibitor of glucose transporter 1 downregulates glycolysis, induces cell-cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol. Cancer Ther.* *11*, 1672–1682.
- Locasale, J.W. (2013). Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 572–583.
- Locasale, J.W., Grassian, A.R., Melman, T., Lyssiotis, C. a, Mattaini, K.R., Bass, A.J., Heffron, G., Metallo, C.M., Muranen, T., Sharfi, H., et al. (2011). Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat. Genet.* *43*, 869–874.
- Lu, C., and Thompson, C.B. (2012). Metabolic regulation of epigenetics. *Cell Metab.* *16*, 9–17.
- Luo, J., Nikolaev, a Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, a, Guarente, L., and Gu, W. (2001). Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* *107*, 137–148.
- Lustig, Y., Ruas, J.L., Estall, J.L., Lo, J.C., Devarakonda, S., Laznik, D., Choi, J.H., Ono, H., Olsen, J. V, and Spiegelman, B.M. (2011). Separation of the gluconeogenic and mitochondrial functions of PGC-1{alpha} through S6 kinase. *Genes Dev.* *25*, 1232–1244.
- Lyssiotis, C. a, Son, J., Cantley, L.C., and Kimmelman, A.C. (2013). Pancreatic cancers rely on a novel glutamine metabolism pathway to maintain redox balance. *Cell Cycle* *12*, 1987–1988.
- Maddocks, O.D.K., Berkers, C.R., Mason, S.M., Zheng, L., Blyth, K., Gottlieb, E., and Vousden, K.H. (2013). Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. *Nature* *493*, 542–546.

Mao, M., Tian, F., Mariadason, J.M., Tsao, C.C., Lemos, R., Dayyani, F., Gopal, Y.N.V., Jiang, Z.-Q., Wistuba, I.I., Tang, X.M., et al. (2013). Resistance to BRAF inhibition in BRAF-mutant colon cancer can be overcome with PI3K inhibition or demethylating agents. *Clin. Cancer Res.* *19*, 657–667.

Mardis, E.R., Ding, L., Dooling, D.J., Larson, D.E., McLellan, M.D., Chen, K., Koboldt, D.C., Fulton, R.S., Delehaanty, K.D., McGrath, S.D., et al. (2009). Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N. Engl. J. Med.* *361*, 1058–1066.

Marin-Valencia, I., Yang, C., Mashimo, T., Cho, S., Baek, H., Yang, X.-L., Rajagopalan, K.N., Maddie, M., Vemireddy, V., Zhao, Z., et al. (2012). Analysis of tumor metabolism reveals mitochondrial glucose oxidation in genetically diverse human glioblastomas in the mouse brain in vivo. *Cell Metab.* *15*, 827–837.

Martin, A., Du, P.A., Liossis, C., Gomez-mun, A., Brien, L.O., Stone, J.C., and Brindley, D.N. (1997). Increased concentrations of phosphatidate, diacylglycerol and ceramide in ras- and tyrosine kinase (fps)-transformed ® broblasts. *Oncogene*.

Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Whitaker-Menezes, D., Howell, A., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2012a). Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis. *Cell Cycle* *11*, 3964–3971.

Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Whitaker-Menezes, D., Howell, A., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2012b). Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis. *Cell Cycle* *11*, 3964–3971.

Martinez-outschoorn, U.E., Curry, J.M., Ko, Y., Lin, Z., Tuluc, M., Cognetti, D., Birbe, R.C., Pribitkin, E., Bombonati, A., Pestell, R.G., et al. (2013). Oncogenes and inflammation rewire host energy metabolism in the tumor microenvironment RAS and NF k B target stromal MCT4. *Cell Cycle* *12*, 2580–2597.

Masui, K., Tanaka, K., Akhavan, D., Babic, I., Gini, B., Matsutani, T., Iwanami, A., Liu, F., Villa, G.R., Gu, Y., et al. (2013). mTOR complex 2 controls glycolytic metabolism in glioblastoma through FoxO acetylation and upregulation of c-Myc. *Cell Metab.* *18*, 726–739.

Mathews, E.H., Stander, B.A., Joubert, A.M., and Liebenberg, L. (2014). Tumor cell culture survival following glucose and glutamine deprivation at typical physiological concentrations. *Nutrition* *30*, 218–227.

Mato, J.M., Corrales, F.J., Lu, S.C., and Avila, M. a (2002). S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *FASEB J.* *16*, 15–26.

Mato, J.M., Martínez-Chantar, M.L., and Lu, S.C. (2008). Methionine metabolism and liver disease. *Annu. Rev. Nutr.* *28*, 273–293.

Matoba, S., Kang, J.-G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., and Hwang, P.M. (2006). P53 Regulates Mitochondrial Respiration. *Science* *312*, 1650–1653.

Matthews RG, Ross J, Baugh CM, Cook JD, D.L. (1982). Interactions of pig liver serine hydroxymethyltransferase with methyltetrahydropteroylpolyglutamate inhibitors and with tetrahydropteroylpolyglutamate substrates. *Biochemistry*.

Mayr, J. a, Meierhofer, D., Zimmermann, F., Feichtinger, R., Kögler, C., Ratschek, M., Schmeller, N., Sperl, W., and Kofler, B. (2008). Loss of complex I due to mitochondrial DNA mutations in renal oncocytoma. *Clin. Cancer Res.* *14*, 2270–2275.

McCarty (1992). R. McCarty M. Futai K. Altendorf. *J Exp Biol*.

Medes, G., Thomas, A., and Weinhouse, S. (1953). Metabolism of Neoplastic Tissue . IV . A Study of Lipid Synthesis in Neoplastic Tissue Slices in Vitro Metabolism of Neoplastic Tissue . IV . A Study of Lipid Synthesis in Neoplastic Tissue Slices in Vitro *. *Cancer Res.* *27–29*.

Melser, S., Chatelain, E.H., Lavie, J., Mahfouf, W., Jose, C., Obre, E., Goorden, S., Priault, M., Elgersma, Y., Rezvani, H.R., et al. (2013). Rheb regulates mitophagy induced by mitochondrial energetic status. *Cell Metab.* *17*, 719–730.

Menendez, J. a, and Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 763–777.

Metallo, C.M., Gameiro, P. a, Bell, E.L., Mattaini, K.R., Yang, J., Hiller, K., Jewell, C.M., Johnson, Z.R., Irvine, D.J., Guarente, L., et al. (2012). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* *481*, 380–384.

Miao, P., Sheng, S., Sun, X., Liu, J., and Huang, G. (2013). Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. *IUBMB Life* *65*, 904–910.

Mills, D. a, Tan, Z., Ferguson-Miller, S., and Hosler, J. (2003). A role for subunit III in proton uptake into the D pathway and a possible proton exit pathway in *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c oxidase. *Biochemistry* *42*, 7410–7417.

Mishra, P., Carelli, V., Manfredi, G., and Chan, D.C. (2014). Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* *19*, 630–641.

Mitchell P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*.

Mitin, N., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr. Biol.* *15*, R563–74.

Modrek, B., and Lee, C. (2002). A genomic view of alternative splicing. *Nat. Genet.* *30*, 13–19.

MOON, A., KIM, M.-S., KIM, T.-G., KIM, S.-H., KIM, H.E., CHEN, Y.Q., and KIM, H.-R.C. (2000). H- RAS , BUT NOT N- RAS , INDUCES AN INVASIVE PHENOTYPE IN HUMAN BREAST EPITHELIAL CELLS : A ROLE FOR MMP-2 IN THE H- RAS -INDUCED INVASIVE PHENOTYPE. *Int. J. Cancer* *181*, 176–181.

Moreno-Sánchez, R., Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J.C., Quezada, H., Encalada, R., Rodríguez-Enríquez, S., and Saavedra, E. (2012). Phosphofructokinase type 1 kinetics, isoform expression, and gene polymorphisms in cancer cells. *J. Cell. Biochem.* *113*, 1692–1703.

Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., and Reik, W. (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum. Mol. Genet.* *14 Spec No*, R47–58.

Morrow, K., Hernandez, C.P., Raber, P., Del Valle, L., Wilk, a M., Majumdar, S., Wyczzechowska, D., Reiss, K., and Rodriguez, P.C. (2013). Anti-leukemic mechanisms of pegylated arginase I in acute lymphoblastic T-cell leukemia. *Leukemia* *27*, 569–577.

Morton, R., Cunningham, C., Jester, R., Waite, M., Miller, N., and Morris, H.P. (1976). Alteration of Mitochondrial Function and Lipid Composition in Morris 7777 Hepatoma Alteration of Mitochondrial Function and Lipid Composition in Morris 7777 Hepatoma1. 3246–3254.

Mostoslavsky, R., Chua, K.F., Lombard, D.B., Pang, W.W., Fischer, M.R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M.M., et al. (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* *124*, 315–329.

Mulki, A.Y. (2005). Ubiquinol oxidation in the cytochrome bc1 complex: reaction mechanism and prevention of short-circuiting. *Biochim. Biophys. Acta* *1709*, 5–34.

- Mullen, A.R., Wheaton, W.W., Jin, E.S., Chen, P.-H., Sullivan, L.B., Cheng, T., Yang, Y., Linehan, W.M., Chandel, N.S., and DeBerardinis, R.J. (2012). Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* *481*, 385–388.
- Muller, F.L., Colla, S., Aquilanti, E., Manzo, V.E., Genovese, G., Lee, J., Eisenson, D., Narurkar, R., Deng, P., Nezi, L., et al. (2012). Passenger deletions generate therapeutic vulnerabilities in cancer. *Nature* *488*, 337–342.
- Mussai, F., De Santo, C., Abu-Dayyeh, I., Booth, S., Quek, L., McEwen-Smith, R.M., Qureshi, A., Dazzi, F., Vyas, P., and Cerundolo, V. (2013). Acute myeloid leukemia creates an arginase-dependent immunosuppressive microenvironment. *Blood* *122*, 749–758.
- Myllyharju, J. (2013). Prolyl 4-hydroxylases, master regulators of the hypoxia response. *Acta Physiol. (Oxf)*. *208*, 148–165.
- Nakajima, E.C., and Van Houten, B. (2013). Metabolic symbiosis in cancer: refocusing the Warburg lens. *Mol. Carcinog.* *52*, 329–337.
- Nakamoto, R.K., Baylis Scanlon, J. a, and Al-Shawi, M.K. (2008). The rotary mechanism of the ATP synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* *476*, 43–50.
- Nakano, K., Bálint, E., Ashcroft, M., and Vousden, K.H. (2000). A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene* *19*, 4283–4289.
- Nakashima, R.A., Paggi, M.G., Pedersen, P.L., and Cells, A.H. (1984). Contributions of Glycolysis and Oxidative Phosphorylation to Adenosine 5' -Triphosphate Production in AS-30D Hepatoma Cells Contributions of Glycolysis and Oxidative Phosphorylation to Adenosine. *Cancer Res.* *5702–5706*.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., and Youle, R.J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* *183*, 795–803.
- Neckelmann, N., Li, K., Wadet, R.P., Shuster, R., and Wallace, D.C. (1987). cDNA sequence of a human skeletal muscle ADP/ATP translocator: Lack of a leader peptide, divergence from a fibroblast translocator cDNA, and coevolution with mitochondrial DNA genes. *84*, 7580–7584.
- Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., et al. (2009). Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* *136*, 521–534.
- Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D.G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., Rogov, V., Löhr, F., Popovic, D., Occhipinti, A., et al. (2010). Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep.* *11*, 45–51.
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., and Ohsumi, Y. (2009). Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev. Cell* *17*, 87–97.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D. a, and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* *99*, 247–257.
- De Oliveira, M.V.M., Andrade, J.M.O., Paraíso, A.F., and Santos, S.H.S. (2013). Sirtuins and cancer: new insights and cell signaling. *Cancer Invest.* *31*, 645–653.
- Omerovic, J., Laude, A.J., and Prior, I.A. (2008). Europe PMC Funders Group Ras proteins : paradigms for compartmentalised and isoform specific signalling. *64*, 2575–2589.
- Opstad, K.S., Bell, B. a, Griffiths, J.R., and Howe, F. a (2009). Taurine: a potential marker of apoptosis in gliomas. *Br. J. Cancer* *100*, 789–794.

Ostojić, J., Panozzo, C., Lasserre, J.-P., Nouet, C., Courtin, F., Blancard, C., di Rago, J.-P., and Dujardin, G. (2013). The energetic state of mitochondria modulates complex III biogenesis through the ATP-dependent activity of Bcs1. *Cell Metab.* 18, 567–577.

Palade, G.E. (1952). The fine structure of mitochondria. *Anat Rec.*

Palade, G.E. (1953). an Electron Microscope Study of the Mitochondrial Structure. *J. Histochem. Cytochem.* 1, 188–211.

Palmieri, F. (2013). The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology. *Mol. Aspects Med.* 34, 465–484.

Palmieri, F. (2014). Mitochondrial transporters of the SLC25 family and associated diseases: a review. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 565–575.

Palmieri, L., Pardo, B., Lasorsa, F.M., del Arco, a, Kobayashi, K., Iijima, M., Runswick, M.J., Walker, J.E., Saheki, T., Satrustegui, J., et al. (2001). Citrin and aralar1 are Ca(2+)-stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria. *EMBO J.* 20, 5060–5069.

Palorini, R., Cammarata, F.P., Cammarata, F., Balestrieri, C., Monestiroli, a, Vasso, M., Gelfi, C., Alberghina, L., and Chiaradonna, F. (2013). Glucose starvation induces cell death in K-ras-transformed cells by interfering with the hexosamine biosynthesis pathway and activating the unfolded protein response. *Cell Death Dis.* 4, e732.

Papandreou, I., Cairns, R. a, Fontana, L., Lim, A.L., and Denko, N.C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 3, 187–197.

Patil, V., Ward, R.L., and Hesson, L.B. (2014). The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. *Epigenetics* 9, 823–828.

Patra, K.C., and Hay, N. (2014). The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem. Sci.* 39, 347–354.

Pavlidis, S., Vera, I., Gandara, R., Sneddon, S., Pestell, R.G., Mercier, I., Martinez-Outschoorn, U.E., Whitaker-Menezes, D., Howell, A., Sotgia, F., et al. (2012). Warburg meets autophagy: cancer-associated fibroblasts accelerate tumor growth and metastasis via oxidative stress, mitophagy, and aerobic glycolysis. *Antioxid. Redox Signal.* 16, 1264–1284.

Pearce, E.L., Walsh, M.C., Cejas, P.J., Harms, G.M., Shen, H., Wang, L.-S., Jones, R.G., and Choi, Y. (2009). Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature* 460, 103–107.

Pearce, E.L., Poffenberger, M.C., Chang, C.-H., and Jones, R.G. (2013). Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science* 342, 1242454.

Phoenix, K.N., Devarakonda, C. V, Fox, M.M., Stevens, L.E., and Claffey, K.P. (2012). AMPK α 2 Suppresses Murine Embryonic Fibroblast Transformation and Tumorigenesis. *Genes Cancer* 3, 51–62.

Pollard, P.J., Brière, J.J., Alam, N. a, Barwell, J., Barclay, E., Wortham, N.C., Hunt, T., Mitchell, M., Olpin, S., Moat, S.J., et al. (2005). Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1 α in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2231–2239.

Porporato, P.E., Payen, V.L., Pérez-Escuredo, J., De Saedeleer, C.J., Danhier, P., Copetti, T., Dhup, S., Tardy, M., Vazeille, T., Bouzin, C., et al. (2014a). A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis. *Cell Rep.*

Porporato, P.E., Payen, V.L., Pérez-Escuredo, J., De Saedeleer, C.J., Danhier, P., Copetti, T., Dhup, S., Tardy, M., Vazeille, T., Bouzin, C., et al. (2014b). A Mitochondrial Switch Promotes Tumor Metastasis. *Cell Rep.*

- Possemato, R., Marks, K.M., Shaul, Y.D., Pacold, M.E., Kim, D., Birsoy, K., Sethumadhavan, S., Woo, H.-K., Jang, H.G., Jha, A.K., et al. (2011a). Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 476, 346–350.
- Possemato, R., Marks, K.M., Shaul, Y.D., Pacold, M.E., Kim, D., Birsoy, K., Sethumadhavan, S., Woo, H.-K., Jang, H.G., Jha, A.K., et al. (2011b). Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature* 476, 346–350.
- Poulsen, H.S., Urup, T., Michaelsen, S.R., and Villingshøj, M. (2014). The impact of bevacizumab treatment on survival and quality of life in newly diagnosed glioblastoma patients. 373–387.
- Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., and Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer* 11, 761–774.
- Qil, H., Yang, D., Wang, M., Tang, Y., Chen, Y., Jiang, H., Torrie, T., Rao, K., Brewer, G.J., Singh, K.K., et al. (2010). Impairment of mitochondrial respiration in mouse fibroblasts by oncogenic H-RASQ61L. *Cancer Biol Ther.* 9, 122–133.
- Raimundo, N., Baysal, B.E., and Shadel, G.S. (2011). Revisiting the TCA cycle: signaling to tumor formation. *Trends Mol. Med.* 17, 641–649.
- Ramos-Mandujano, G., Hernández-Benítez, R., and Pasantes-Morales, H. (2014). Multiple mechanisms mediate the taurine-induced proliferation of neural stem/progenitor cells from the subventricular zone of the adult mouse. *Stem Cell Res.* 12, 690–702.
- Rasola, A., Neckers, L., and Picard, D. (2014). Mitochondrial oxidative phosphorylation TRAP(1)ped in tumor cells. *Trends Cell Biol.* 24, 455–463.
- Rehling, P., Brandner, K., and Pfanner, N. (2004). Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 519–530.
- Remacle, C., Barbieri, M.R., Cardol, P., and Hamel, P.P. (2008). Eukaryotic complex I: functional diversity and experimental systems to unravel the assembly process. *Mol. Genet. Genomics* 280, 93–110.
- Rich (2003). *Chemiosmotic.* 421, 2003.
- Rimessi, a, Marchi, S., Patergnani, S., and Pinton, P. (2014). H-Ras-driven tumoral maintenance is sustained through caveolin-1-dependent alterations in calcium signaling. *Oncogene* 33, 2329–2340.
- Roberts, P.J., and Der, C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26, 3291–3310.
- Robinson, A.J., Kunji, E.R.S., and Gross, A. (2012). Mitochondrial carrier homolog 2 (XXXX): the recruitment and evolution of a mitochondrial carrier protein to a critical player in apoptosis. *Exp. Cell Res.* 318, 1316–1323.
- Rodrigues, J. V., and Gomes, C.M. (2012). Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide generation by human electron-transfer flavoprotein and pathological variants. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 12–19.
- Roesch, A., Vultur, A., Bogeski, I., Wang, H., Zimmermann, K.M., Speicher, D., Körbel, C., Laschke, M.W., Gimotty, P. a, Philipp, S.E., et al. (2013). Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. *Cancer Cell* 23, 811–825.
- Rolfe DF, B.G. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev.*

Rossignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J., and Capaldi, R.A. (2004). Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells. 985–993.

Rötig A, de Lonlay P, Chretien D, Foury F, Koenig M, Sidi D, Munnich A, R.P. (1997). Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet.*

Rozei, C., Kalthoffii, H., and Ullrich, A. (1996). A tumor-selective somatostatin analog (TT-232) with strong in vitro and in vivo antitumor activity. *93*, 12513–12518.

Russo, M., Di Nicolantonio, F., and Bardelli, A. (2014). Climbing RAS, the everest of oncogenes. *Cancer Discov.* *4*, 19–21.

Ryffel, G.U. (2001). Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J. Mol. Endocrinol.* *27*, 11–29.

Rysman, E., Brusselmans, K., Scheys, K., Timmermans, L., Derua, R., Munck, S., Van Veldhoven, P.P., Waltregny, D., Daniëls, V.W., Machiels, J., et al. (2010). De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res.* *70*, 8117–8126.

Salceda, S., and Caro, J. (1997). Hypoxia-inducible Factor 1 (HIF-1) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions: ITS STABILIZATION BY HYPOXIA DEPENDS ON REDOX-INDUCED CHANGES. *J. Biol. Chem.* *272*, 22642–22647.

Salminen, A., Kauppinen, A., Hiltunen, M., and Kaarniranta, K. (2014). Krebs cycle intermediates regulate DNA and histone methylation: Epigenetic impact on the aging process. *Ageing Res. Rev.* *16C*, 45–65.

Sandoval, H., Thiagarajan, P., Dasgupta, S.K., Schumacher, A., Prchal, J.T., Chen, M., and Wang, J. (2008). Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* *454*, 232–235.

Schägger, H. (2001). Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB Life* *52*, 119–128.

Scheffler (1999). MITOCHONDRIA.

Scheffzek, K. (1997). The Ras-RasGAP Complex: Structural Basis for GTPase Activation and Its Loss in Oncogenic Ras Mutants. *Science* (80-.). *277*, 333–338.

Schleyer, M., Schmidt, B., and Neupert, W. (1982). Requirement of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria. *Eur. J. Biochem.* *125*, 109–116.

Schrauwen, P., Troost, F.J., Xia, J., Ravussin, E., and Saris, W.H. (1999). Skeletal muscle UCP2 and UCP3 expression in trained and untrained male subjects. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* *23*, 966–972.

Schroeder, R.L., Stevens, C.L., and Sridhar, J. (2014). Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors of ErbB2/HER2/Neu in the Treatment of Aggressive Breast Cancer. *Molecules* *19*, 15196–15212.

Schubbert, S., Shannon, K., and Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 295–308.

Schwartzberg-Bar-Yoseph, F., Armoni, M., and Karnieli, E. (2004). The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res.* *64*, 2627–2633.

Sciacovelli, M., Guzzo, G., Morello, V., Frezza, C., Zheng, L., Nannini, N., Calabrese, F., Laudiero, G., Esposito, F., Landriscina, M., et al. (2013). The mitochondrial chaperone TRAP1 promotes neoplastic growth by inhibiting succinate dehydrogenase. *Cell Metab.* *17*, 988–999.

Scotland, S., Saland, E., Skuli, N., de Toni, F., Boutzen, H., Micklow, E., S  n  gas, I., Peyraud, R., Peyriga, L., Th  odoro, F., et al. (2013). Mitochondrial energetic and AKT status mediate metabolic effects and apoptosis of metformin in human leukemic cells. *Leukemia* 27, 2129–2138.

Sermeus, a, and Michiels, C. (2011). Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. *Cell Death Dis.* 2, e164.

Severinghaus, J.W., and Astrup, P.B. (1986). Historical Review.

Sharma, N., Okere, I.C., Brunengraber, D.Z., McElfresh, T. a, King, K.L., Sterk, J.P., Huang, H., Chandler, M.P., and Stanley, W.C. (2005). Regulation of pyruvate dehydrogenase activity and citric acid cycle intermediates during high cardiac power generation. *J. Physiol.* 562, 593–603.

Shaw, R.J., and Cantley, L.C. (2006). Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441, 424–430.

Shiba-Fukushima, K., Imai, Y., Yoshida, S., Ishihama, Y., Kanao, T., Sato, S., and Hattori, N. (2012). PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy. *Sci. Rep.* 2, 1002.

Shukla, K., Ferraris, D. V, Thomas, A.G., Stathis, M., Duvall, B., Delahanty, G., Alt, J., Rais, R., Rojas, C., Gao, P., et al. (2012). Krupa Shukla, Dana V. Ferraris, Ajit G. Thomas, Marigo Stathis, Bridget Duvall, Greg Delahanty, Jesse Alt, Rana Rais, Camilo Rojas, Ping Gao, Yan Xiang, Chi V. Dang, Barbara S. Slusher, Takashi Tsukamoto. *J. Med. Chem.* 3.

Slomovitz, B.M., and Coleman, R.L. (2012). The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. *Clin. Cancer Res.* 18, 5856–5864.

Smolkov  , K., Plecit  -Hlavat  , L., Bellance, N., Benard, G., Rossignol, R., and Je  ek, P. (2011). Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 950–968.

Son, J., Lyssiotis, C. a, Ying, H., Wang, X., Hua, S., Ligorio, M., Perera, R.M., Ferrone, C.R., Mullarky, E., Shyh-Chang, N., et al. (2013). Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature* 496, 101–105.

Sones, N., Sekimachi, M., and Kutoh, E. (1987). Identification and Properties of. 262, 15386–15391.

Sonveaux, P., V  gran, F., Schroeder, T., Wergin, M.C., Verrax, J., Rabbani, Z.N., De Saedeleer, C.J., Kennedy, K.M., Diepart, C., Jordan, B.F., et al. (2008a). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 3930–3942.

Sonveaux, P., V  gran, F., Schroeder, T., Wergin, M.C., Verrax, J., Rabbani, Z.N., De Saedeleer, C.J., Kennedy, K.M., Diepart, C., Jordan, B.F., et al. (2008b). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 3930–3942.

Stapleton, D., Mitchelhill, K.I., Gao, G., Widmer, J., Michell, B.J., Teh, T., House, C.M., Fernandez, C.S., Cox, T., Witters, L. a, et al. (1996). Mammalian AMP-activated Protein Kinase Subfamily. *J. Biol. Chem.* 271, 611–614.

Stark, R., and Kibbey, R.G. (2014). The mitochondrial isoform of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK-M) and glucose homeostasis: has it been overlooked? *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 1313–1330.

Stobbe, M.D., Houten, S.M., van Kampen, A.H.C., Wanders, R.J. a, and Moerland, P.D. (2012). Improving the description of metabolic networks: the TCA cycle as example. *FASEB J.* 26, 3625–3636.

Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, a G., and Walker, J.E. (2000). The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 672–679.

Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modi ® cations. 403, 41–45.

Sullivan, L.B., Martinez-Garcia, E., Nguyen, H., Mullen, A.R., Dufour, E., Sudarshan, S., Licht, J.D., Deberardinis, R.J., and Chandel, N.S. (2013). The proto-oncometabolite fumarate binds glutathione to amplify ROS-dependent signaling. *Mol. Cell* 51, 236–248.

Szabadkai, G., Simoni, A.M., and Rizzuto, R. (2003). Mitochondrial Ca²⁺ uptake requires sustained Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 278, 15153–15161.

Tanios, R., Bekdash, A., Kassab, E., Stone, E., Georgiou, G., Frankel, A.E., and Abi-Habib, R.J. (2013). Human recombinant arginase I(Co)-PEG5000 [HuArgI(Co)-PEG5000]-induced arginine depletion is selectively cytotoxic to human acute myeloid leukemia cells. *Leuk. Res.* 37, 1565–1571.

Teh, J.T., Zhu, W.L., Ilkayeva, O.R., Li, Y., Gooding, J., Casey, P.J., Summers, S. a, Newgard, C.B., and Wang, M. (2014). Isoprenylcysteine carboxymethyltransferase regulates mitochondrial respiration and cancer cell metabolism. *Oncogene* 1–9.

Telang, S., Yalcin, a, Clem, a L., Bucala, R., Lane, a N., Eaton, J.W., and Chesney, J. (2006). Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene* 25, 7225–7234.

Telang, S., Lane, A.N., Nelson, K.K., Arumugam, S., and Chesney, J. (2007a). The oncoprotein H-RasV12 increases mitochondrial metabolism. *Mol. Cancer* 6, 77.

Telang, S., Lane, A.N., Nelson, K.K., Arumugam, S., and Chesney, J. (2007b). The oncoprotein H-RasV12 increases mitochondrial metabolism. *Mol. Cancer* 6, 77.

Teodoro, J.G., Parker, A.E., Zhu, X., and Green, M.R. (2006). P53-Mediated Inhibition of Angiogenesis Through Up-Regulation of a Collagen Prolyl Hydroxylase. *Science* 313, 968–971.

Thiele, I., Swainston, N., Fleming, R.M.T., Hoppe, A., Sahoo, S., Aurich, M.K., Haraldsdottir, H., Mo, M.L., Rolfsson, O., Stobbe, M.D., et al. (2013). A community-driven global reconstruction of human metabolism. *Nat. Biotechnol.* 31, 419–425.

Thompson, P., Balis, F., Serabe, B.M., Berg, S., Adamson, P., Klenke, R., Aiken, A., Packer, R., Murry, D.J., Jakacki, R., et al. (2003). Pharmacokinetics of phenylacetate administered as a 30-min infusion in children with refractory cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 52, 417–423.

Tomlinson, I.P.M., Alam, N.A., Rowan, A.J., Barclay, E., Jaeger, E.E.M., Kelsell, D., Leigh, I., Gorman, P., Lamlum, H., Rahman, S., et al. (2002). Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat. Genet.* 30, 406–410.

Tong, X., Zhao, F., and Thompson, C.B. (2009). The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 32–37.

Tora, L., Gassmann, M., Poellinger, L., Gradin, K., Guire, J.M.C., Wenger, R.H., Kvietikova, I., Whitelaw, M.L., Toftgård, R., Tora, L., et al. (1996). Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways : competition for recruitment of the Arnt transcription factor . Functional Interference between Hypoxia and Dioxin Signal Transduction Pathways : Competition for Recruitment .

Toroser, D., and Sohal, R.S. (2007). Age-associated perturbations in glutathione synthesis in mouse liver. *Biochem. J.* 405, 583–589.

Trebbak, J.T., Glund, S., Deshmukh, A., Klein, D.K., Long, Y.C., Jensen, T.E., Jørgensen, S.B., Viollet, B., Andersson, L., Neumann, D., et al. (2006). AMPK-mediated AS160 phosphorylation in skeletal muscle is dependent on AMPK catalytic and regulatory subunits. *Diabetes* 55, 2051–2058.

Trézéguet V, Pélosi L, Lauquin GJ, B.G. (2008). The mitochondrial ADP/ATP carrier: functional and structural studies in the route of elucidating pathophysiological aspects. *J Bioenerg Biomembr*.

Tsao CY, Mendell JR, B.D. (2001). High mitochondrial DNA T8993G mutation (<90%) without typical features of Leigh's and NARP syndromes. *J Child Neurol*.

Turner, N., Cooney, G.J., Kraegen, E.W., and Bruce, C.R. (2014). Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle. *J. Endocrinol.* 220, T61–79.

Ubuka, T., Okada, a, and Nakamura, H. (2008). Production of hypotaurine from L-cysteinesulfinate by rat liver mitochondria. *Amino Acids* 35, 53–58.

Vakhrusheva, O., Smolka, C., Gajawada, P., Kostin, S., Boettger, T., Kubin, T., Braun, T., and Bober, E. (2008). Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ. Res.* 102, 703–710.

Valencia, T., Kim, J.Y., Abu-Baker, S., Moscat-Pardos, J., Ahn, C.S., Reina-Campos, M., Duran, A., Castilla, E. a, Metallo, C.M., Diaz-Meco, M.T., et al. (2014). Metabolic Reprogramming of Stromal Fibroblasts through p62-mTORC1 Signaling Promotes Inflammation and Tumorigenesis. *Cancer Cell* 26, 121–135.

Vance, J.E., and Vance, E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria . Phospholipid Mitochondria * Synthesis in a Membrane Fraction Associated. 7248–7256.

Varley, K.E., Gertz, J., Bowling, K.M., Parker, S.L., Reddy, T.E., Pauli-Behn, F., Cross, M.K., Williams, B. a, Stamatoyannopoulos, J. a, Crawford, G.E., et al. (2013). Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res.* 23, 555–567.

Vaupel, P. (2004). Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin. Radiat. Oncol.* 14, 198–206.

Vaupel, P., and Mayer, A. (2012). Availability, not respiratory capacity governs oxygen consumption of solid tumors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 1477–1481.

Vaupel, P., Fortmeyer, H.P., Runkel, S., and Kallinowski, F. (1987). Blood Flow , Oxygen Consumption , and Tissue Oxygenation of Human Breast Cancer Xenografts in Nude Rats Blood Flow , Oxygen Consumption , and Tissue OxygÄ © nation of Human Breast Cancer Xenografts in Nude Rats1. 3496–3503.

Vaupel, P., Kallinowski, F., Okunieff, P., and Review, H.T.A. (1989). Blood Flow , Oxygen and Nutrient Supply , and Metabolic Microenvironment of Human Tumors : A Review. 6449–6465.

Van Veelen, W., Korsse, S.E., van de Laar, L., and Peppelenbosch, M.P. (2011). The long and winding road to rational treatment of cancer associated with LKB1/AMPK/TSC/mTORC1 signaling. *Oncogene* 30, 2289–2303.

Vié, N., Copois, V., Bascoul-Mollevi, C., Denis, V., Bec, N., Robert, B., Fraslou, C., Conseiller, E., Molina, F., Larroque, C., et al. (2008). Overexpression of phosphoserine aminotransferase PSAT1 stimulates cell growth and increases chemoresistance of colon cancer cells. *Mol. Cancer* 7, 14.

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L. a, and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science* 339, 1546–1558.

Vogelzang, N.J., Bhor, M., Liu, Z., Dhanda, R., and Hutson, T.E. (2013). Everolimus vs. temsirolimus for advanced renal cell carcinoma: use and use of resources in the US Oncology Network. *Clin. Genitourin. Cancer* 11, 115–120.

- Vousden, K.H., and Ryan, K.M. (2009). P53 and Metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 9, 691–700.
- Voza, A., Parisi, G., De Leonardis, F., Lasorsa, F.M., Castegna, A., Amorese, D., Marmo, R., Calcagnile, V.M., Palmieri, L., Ricquier, D., et al. (2014). UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 960–965.
- Wanders, R.J. a (2014). Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie* 98, 36–44.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E. a, and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5510–5514.
- Wang, Z., Li, Y., and Sarkar, F.H. (2010). Signaling Mechanism (S) of Reactive Oxygen Species in Epithelial-Mesenchymal Transition Reminiscent of Cancer Stem Cells in Tumor Progression. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 74–80.
- Warburg, B.Y.O., and Wind, F. (1927). I . Killing-Off of Tumor Cells in Vitro .
- Ward, P.S., and Thompson, C.B. (2012). Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 21, 297–308.
- Warskulat, U., Borsch, E., Reinehr, R., Heller-stilb, B., Mönnighoff, I., Buchczyk, D., Donner, M., Flögel, U., Kappert, G., Soboll, S., et al. (2006). knockout in the mouse. *FASEB* 35, 1–35.
- Watmough, N.J., and Frerman, F.E. (2010). The electron transfer flavoprotein: ubiquinone oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1910–1916.
- Watt, A.J., Garrison, W.D., and Duncan, S. a (2003). HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology* 37, 1249–1253.
- Wei, B.-R., Simpson, R.M., Johann, D.J., Dwyer, J.E., Prieto, D. a, Kumar, M., Ye, X., Luke, B., Shive, H.R., Webster, J.D., et al. (2012). Proteomic profiling of H-Ras-G12V induced hypertrophic cardiomyopathy in transgenic mice using comparative LC-MS analysis of thin fresh-frozen tissue sections. *J. Proteome Res.* 11, 1561–1570.
- Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W.W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G.M., Budinger, G.R.S., and Chandel, N.S. (2010). Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8788–8793.
- Weinhouse (1956). On respiratory impairment in cancer cells.
- Wellen, K.E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U.M., Bui, T. V, Cross, J.R., and Thompson, C.B. (2009). ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* 324, 1076–1080.
- Whitaker-Menezes, D., Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Ertel, A., Flomenberg, N., Witkiewicz, A.K., Birbe, R., Howell, A., Pavlides, S., Gandara, R., et al. (2011). Evidence for a stromal-epithelial “lactate shuttle” in human tumors: MCT4 is a marker of oxidative stress in cancer-associated fibroblasts. *Cell Cycle* 10, 1772–1783.
- Wise, D.R., and Thompson, C.B. (2011). NIH Public Access. 35, 427–433.
- Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.-Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B., et al. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18782–18787.
- Wise, D.R., Ward, P.S., Shay, J.E.S., Cross, J.R., Gruber, J.J., Sachdeva, U.M., Platt, J.M., DeMatteo, R.G., Simon, M.C., and Thompson, C.B. (2011). Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation

of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 19611–19616.

Wolffe, a. P. (1999). Epigenetics: Regulation Through Repression. *Science* (80-.). *286*, 481–486.

Wood, L.D., Parsons, D.W., Jones, S., Lin, J., Sjöblom, T., Leary, R.J., Shen, D., Boca, S.M., Barber, T., Ptak, J., et al. (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* *318*, 1108–1113.

Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., et al. (1999). Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *98*, 115–124.

Xiao, M., Yang, H., Xu, W., Ma, S., Lin, H., Zhu, H., Liu, L., Liu, Y., Yang, C., Xu, Y., et al. (2012). Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev.* *26*, 1326–1338.

Xie, M., Zhang, D., Dyck, J.R.B., Li, Y., Zhang, H., Morishima, M., Mann, D.L., Taffet, G.E., Baldini, A., Khoury, D.S., et al. (2006). A pivotal role for endogenous TGF-beta-activated kinase-1 in the LKB1/AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 17378–17383.

Yang, M., Soga, T., and Pollard, P.J. (2013). Review series Oncometabolites : linking altered metabolism with cancer. *123*.

Yang, M., Haase, A.D., Huang, F.-K., Coulis, G., Rivera, K.D., Dickinson, B.C., Chang, C.J., Pappin, D.J., Neubert, T. a, Hannon, G.J., et al. (2014a). Dephosphorylation of Tyrosine 393 in Argonaute 2 by Protein Tyrosine Phosphatase 1B Regulates Gene Silencing in Oncogenic RAS-Induced Senescence. *Mol. Cell* *55*, 782–790.

Yang, Y., Wu, J., Cai, J., He, Z., Yuan, J., Zhu, X., Li, Y., Li, M., and Guan, H. (2014b). PSAT1 regulates cyclin D1 degradation and sustains proliferation of non-small cell lung cancer cells. *Int. J. Cancer* *86*.

Ye, J., Mancuso, A., Tong, X., Ward, P.S., Fan, J., Rabinowitz, J.D., and Thompson, C.B. (2012). Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 6904–6909.

Yerushalmi, G.M., Leibowitz-Amit, R., Shaharabany, M., and Tsarfaty, I. (2002). Met-HGF/SF signal transduction induces mimp, a novel mitochondrial carrier homologue, which leads to mitochondrial depolarization. *Neoplasia* *4*, 510–522.

Ying, H., Kimmelman, A.C., Lyssiotis, C. a, Hua, S., Chu, G.C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J.W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J.L., et al. (2012). Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* *149*, 656–670.

Yizhak, K., Dévédec, S.E. Le, Rogkoti, V.M., Baenke, F., Boer, V.C. De, Frezza, C., Schulze, A., Water, B. Van De, and Ruppin, E. (2014). A computational study of the Warburg effect identifies metabolic targets inhibiting cancer migration. *1–12*.

Yoder, J. a, Soman, N.S., Verdine, G.L., and Bestor, T.H. (1997). DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. *J. Mol. Biol.* *270*, 385–395.

Yoshida, S., Tsutsumi, S., Muhlebach, G., Sourbier, C., Lee, M., and Lee, S. (2013). Molecular chaperone TRAP1 regulates a metabolic switch between mitochondrial respiration and aerobic glycolysis.

Youle, R.J., and Karbowski, M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 657–663.

Yu, K., Ganesan, K., Tan, L.K., Laban, M., Wu, J., Zhao, X.D., Li, H., Leung, C.H.W., Zhu, Y., Wei, C.L., et al. (2008). A precisely regulated gene expression cassette potently modulates metastasis and survival in multiple solid cancers. *PLoS Genet.* 4, e1000129.

Zaltsman, Y., Shachnai, L., Yivgi-Ohana, N., Schwarz, M., Maryanovich, M., Houtkooper, R.H., Vaz, F.M., De Leonardis, F., Fiermonte, G., Palmieri, F., et al. (2010). XXXX/MIMP is a major facilitator of tBID recruitment to mitochondria. *Nat. Cell Biol.* 12, 553–562.

Zhang, B., Davidson, M.M., Zhou, H., Wang, C., Walker, W.F., and Hei, T.K. (2013). Cytoplasmic irradiation results in mitochondrial dysfunction and DRP1-dependent mitochondrial fission. *Cancer Res.* 73, 6700–6710.

Zhang, B., Wang, J., Wang, X., Zhu, J., Liu, Q., Shi, Z., Chambers, M.C., Zimmerman, L.J., Shaddox, K.F., Kim, S., et al. (2014). Proteogenomic characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*.

Zhao, J., Zhang, J., Yu, M., Xie, Y., Huang, Y., Wolff, D.W., Abel, P.W., and Tu, Y. (2013). Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 32, 4814–4824.

Zhao, Y., Liu, H., Liu, Z., Ding, Y., Ledoux, S.P., Wilson, G.L., Voellmy, R., Lin, Y., Lin, W., Nahta, R., et al. (2011). Overcoming trastuzumab resistance in breast cancer by targeting dysregulated glucose metabolism. *Cancer Res.* 71, 4585–4597.

Zheng, B., Jeong, J.H., Asara, J.M., Yuan, Y.-Y., Granter, S.R., Chin, L., and Cantley, L.C. (2009). Oncogenic B-Raf negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. *Mol. Cell* 33, 237–247.

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., et al. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *108*, 1167–1174.

Ziller, M.J., Müller, F., Liao, J., Zhang, Y., Gu, H., Bock, C., Boyle, P., Epstein, C.B., Bernstein, B.E., Lengauer, T., et al. (2011). Genomic distribution and inter-sample variation of non-CpG methylation across human cell types. *PLoS Genet.* 7, e1002389.

CONCLUSION GENERALE

Ma thèse s'est intéressée au remodelage métabolique des cellules cancéreuses. Les trois modèles étudiés ont révélé un rôle important pour la mitochondrie, à la fois pour l'apport d'énergie et pour la synthèse de composés comme des antioxydants et des acides aminés mais aussi des phospholipides. J'ai montré l'impact large-spectre d'une simple mutation HRAS_{G12V} sur un très grand nombre de processus, révélant ainsi l'importance de la génétique dans le remodelage métabolique des cellules cancéreuses. Toutefois, la privation de glucose induit elle aussi un remarquable remodelage à de très nombreux niveaux, depuis l'épissage des ARN messagers jusqu'à la synthèse de sérine. La synthèse de ces deux parties peut-être considérée comme la troisième partie qui s'est intéressée à l'analyse de tumeurs du poumon, avec la collaboration d'un service clinique. Il est apparu l'existence de deux classes bioénergétiques de tumeurs de poumon, ouvrant de nombreuses perspectives pour le diagnostic et la compréhension de ce type de tumeur, mais aussi la proposition de stratégies thérapeutiques adaptées.

La recherche fondamentale et translationnelle décrite dans ma thèse affiche un objectif motivé de mieux comprendre le remodelage métabolique des cellules cancéreuses et de proposer des stratégies thérapeutiques. J'ai identifié des biomarqueurs et des cibles validées sur nos modèles *in vitro*. Il convient à présent de nous rapprocher des cliniciens pour avancer dans l'éradication de cette maladie, en transposant nos idées sur des modèles réels avec toute les difficultés que cela comporte.